

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 808**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012** **PCT/JP2012/069131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013** **WO2013018690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012** **E 12820786 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016** **EP 2738255**

54 Título: **Péptido derivado de ERAP1 y uso del mismo**

30 Prioridad:

29.07.2011 JP 2011167171

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2017

73 Titular/es:

ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (50.0%)
2-1 Sakado 3-chome Takatsu-ku
Kawasaki-shi Kanagawa 213-0012, JP y
TOKUSHIMA UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

KATAGIRI, TOYOMASA y
TSUNODA, TAKUYA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 613 808 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido derivado de ERAP1 y uso del mismo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un péptido derivado de ERAP1 y al uso terapéutico del mismo.

5 Antecedentes de la técnica

El cáncer de mama es el cáncer de más alta incidencia en las mujeres japonesas. El cáncer de mama a menudo depende de las hormonas (estrógeno: E2). La proliferación del cáncer de mama se promueve a través de la activación de un receptor hormonal (receptor de estrógenos: ER). Como mecanismos para la proliferación del cáncer de mama mediante la activación del RE, se han publicado dos mecanismos diferentes: un mecanismo en el que el RE funciona como un regulador transcripcional (activación genómica); y un mecanismo en el que el RE participa en la activación de la cascada de fosforilación intracelular como un RE tipo membrana localizado en la membrana celular (activación no genómica) (documentos no de patente 1 a 3). Sin embargo, todavía hay muchos puntos poco claros para el mecanismo molecular de la propia activación del RE.

Además, la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de mama mejora notablemente mediante el uso del tamoxifeno (TAM), como un antiestrógeno en la terapia adyuvante postoperatoria o en el tratamiento estándar del cáncer de mama avanzado o recidivante. Sin embargo, alrededor del 30% del cáncer de mama RE-positivo es refractario al TAM. Asimismo, de acuerdo con los tratamientos estándar, el TAM se administra durante 5 años en las terapias adyuvantes postoperatorias. Por lo tanto, existe un serio problema por el que el uso prolongado de TAM hace que las células de cáncer de mama se hagan resistentes a TAM (documentos no de patente 1 a 3). Como mecanismo de esta refractariedad o resistencia al TAM, hay varios mecanismos comunicados; tales como la acelerada sensibilidad a los estrógenos, y la interferencia de receptores de membrana, tales como EGFR, HER2 e IGFR con una ruta de señal del factor de crecimiento (documentos no de patente 1 a 3). Sin embargo, todavía hay muchos puntos poco claros sobre el mecanismo refractario o de resistencia a TAM. Además, en los últimos años, los inhibidores de aromataza o las preparaciones de agonistas de LH-RH también se utilizan en el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, estos medicamentos inhiben la producción de estrógenos. Por lo tanto, se presentan efectos secundarios, tales como una disminución en la densidad ósea debido a una disminución en el nivel de estrógenos. Como se describió anteriormente, los problemas urgentes son la elucidación del mecanismo de la actividad regulada por RE del cáncer de mama dependiente de E2 y el desarrollo de un nuevo agente terapéutico para el cáncer de mama dependiente de E2.

Los presentes inventores han identificado hasta el momento una nueva proteína regulada por la actividad del receptor de estrógenos 1 (ERAP1) (también conocida como BIG3) que se ha observado que es altamente expresada específicamente en el cáncer de mama a alta frecuencia, a través de un análisis global de la expresión génica en el cáncer de mama utilizando un microarray de cDNA (Documento de Patente 1 y Documento no de patente 4). Los resultados, que se describen a continuación, se obtienen mediante un análisis detallado de las funciones de ERAP1. A saber, ERAP1 se une a la proteína PHB2/REA (prohibitina 2/represor de la actividad de estrógenos), un represor de la activación de RE en el citoplasma, que bloquea la translocación nuclear dependiente de E2 de PHB2/REA. Por lo tanto, ERAP1 puede conducir a la activación constitutiva de RE en las células del cáncer de mama mediante la inhibición de la función de supresión de la actividad de RE α de PHB2/REA (Documento de patente 1 y Documento no de Patente 4)

Documentos de la técnica relacionada

Documentos de patente

Documento de Patente 1: WO 2008/018642

Documentos no de patente

Documento de no patente 1: Osborne CK, Schiff R. J Clin Oncol. 2005; 23: 1616-1622.

Documento de no patente 2: Yager JD, Davidson NE. N Engl J Med. 2006; 354: 270-82.

Documento de no patente 3: Johnston SR. Clin Cancer Res. 2010;16: 1979-1987.

Documento de no patente 4: Kim JW, Akiyama M, Park JH, et al. Cancer Sci. 2009; 100: 1468-1478.

Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

Un problema a ser resuelto por la presente invención es proporcionar un péptido útil para el tratamiento del cáncer de mama y similares, y la aplicación del péptido a la terapia del cáncer de mama.

Soluciones a los problemas

Los presentes inventores han encontrado que un fragmento de péptido de ERAP1 (péptido ERAP1) que comprende un sitio de unión a PHB2 inhibe la unión de ERAP1 a PHB2 para causar la translocación nuclear de PHB2, lo que provoca la supresión de la activación transcripcional de RE por PHB2. Además, los presentes inventores han confirmado que PHB2 se disocia de ERAP1 y se une a RE en la membrana celular, y suprime la activación de la ruta de Akt, la activación de la ruta MAPK, y la fosforilación del RE nuclear. Por lo tanto, los presentes inventores han confirmado que el péptido ERAP1 suprime tanto la ruta de activación genómica como la ruta de activación no genómica de RE. Además, los presentes inventores han confirmado que el péptido ERAP1 también suprime la regulación a la baja por la degradación de proteínas de RE por la vía de la ubiquitina-proteasoma, que es esencial para la activación transcripcional del RE. A saber, los presentes inventores han confirmado que el péptido ERAP1 suprime por completo la activación transcripcional de RE. Además, los presentes inventores han confirmado que el péptido ERAP1 tiene un efecto antitumoral en el cáncer de mama dependiente de estrógenos. A saber, el péptido ERAP1 suprime la proliferación celular dependiente de estrógenos de las células de cáncer de mama ER-positivas. Además, el péptido ERAP1 también exhibe efectos antitumorales en pruebas con ratones ortotópicamente trasplantados con células de cáncer de mama. Además, los presentes inventores han encontrado que el péptido ERAP1 también tiene un efecto de supresión sobre la proliferación de células no dependiente de estrógenos de las células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógeno. Además, los presentes inventores han encontrado que el péptido ERAP1 suprime la proliferación celular de las células de cáncer de mama resistentes a tamoxifeno. Además, los presentes inventores han confirmado que el uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno tienen un efecto antitumoral mayor que el uso individual de los mismos.

Además, los presentes inventores han encontrado que la fosforilación en Ser39 de PHB2 es importante para la supresión de la proliferación celular dependiente de estrógenos. Los presentes inventores han confirmado que la fosforilación en Ser39 de PHB2 es debida a la desfosforilación del PP1 α que está unido indirectamente a través de ERAP1. Además, los presentes inventores han confirmado que la actividad de la fosfatasa de PP1 α está regulada por la fosforilación de ERAP1 por PKA y PKB. Estos resultados muestran que la unión de ERAP1 a PKA, PKB, o PP1 α juega un papel importante en la proliferación celular dependiente de estrógenos.

Además, los presentes inventores han confirmado que el péptido ERAP1 también suprime la proliferación de células de cáncer de mama negativo para el receptor de estrógenos.

La presente invención se basa en los hallazgos descritos anteriormente, y es como se define en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

Efectos de la invención

Según la presente invención, se proporciona un péptido ERAP1 útil para tratar y/o prevenir el cáncer, en particular el cáncer positivo para receptor de estrógenos. De acuerdo con el péptido ERAP1 de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer, más específicamente el cáncer positivo para el receptor de estrógenos. Los cánceres en los que el péptido ERAP1 de la presente invención pueden ejercer efectos deseados incluyen el cáncer de mama dependiente de estrógenos. La presente invención proporciona una técnica terapéutica con un nuevo mecanismo para el cáncer de mama dependiente de estrógenos para el que se ha deseado una nueva técnica terapéutica.

Además, de acuerdo con la presente descripción, se proporciona un método para el cribado de un material candidato para un fármaco útil para tratar y/o prevenir el cáncer, en particular el cáncer positivo para el receptor de estrógenos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1-1 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 transcelular se une a PHB2, e inhibe la interacción entre ERAP1 y PHB2. (A) es un diagrama esquemático que ilustra tres clones del fragmento Flag-ERAP1 del que o bien se suprime uno de ERAP1 humano como una región terminal del mismo. (B) es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se identificó la región de unión a PHB2 de ERAP1. Células COS-7 fueron transfectadas con cualquiera de los constructos ERAP1 mostrados en la figura (ERAP1 de longitud completa, ERAP1₁₋₄₃₄, ERAP1₄₃₅₋₂₁₇₇, y ERAP1₁₄₆₈₋₂₁₇₇) junto con el constructo PHB2. Las células se lisaron después de 48 horas de la transfección. Entonces, el ERAP1 marcado con Flag se inmunoprecipitó a partir del lisado celular con el anticuerpo anti-Flag. La proteína inmunoprecipitada y el lisado celular (de entrada) se sometieron a análisis de inmunotransferencia (IB) utilizando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 1-2 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 transcelular se une a PHB2, e inhibe la interacción entre ERAP1 y PHB2. (C) es un diagrama esquemático que ilustra el clon del fragmento Flag-ERAP1 de ERAP1₁₋₄₃₄ y dos clones del fragmento Flag-ERAP1 del que la región terminal C de ERAP1₁₋₄₃₄ está suprimida. (D) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por la cual se identificó la región de unión a PHB2 en ERAP1₁₋₄₃₄. Células COS-7 fueron transfectadas con cualquiera de los constructos de ERAP1 que se muestra en (C) (ERAP1₁₋₄₃₄, ERAP1₁₋₂₅₀, ERAP1₁₋₁₀₀) junto con el constructo PHB2. Las células se lisaron después de 48 horas de la transfección. Entonces, el ERAP1 marcado con Flag se inmunoprecipitó a partir del lisado celular con el anticuerpo

anti-Flag. La proteína inmunoprecipitada y el lisado celular (de entrada) se sometieron a análisis de inmunotransferencia (IB) utilizando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 1-3 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 transcelular se une a PHB2, e inhibe la interacción entre ERAP1 y PHB2. (E) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que la variante de ERAP1-delecionada inhibe la interacción entre ERAP1 y PHB2. Células COS-7 fueron transfectadas con ERAP1 de Flag-longitud completa, un constructo de HA-PHB2, y una construcción de la variante ERAP1-delecionada (Δ ERAP1: ERAP1₁₋₄₃₄) en las concentraciones mostradas en la figura. Las células se lisaron después de 48 horas de la transfección. Entonces, el PHB2 marcado con HA se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-HA. La proteína inmunoprecipitada y el lisado celular (de entrada) se sometieron a análisis de inmunotransferencia utilizando los anticuerpos que se muestran en la figura. (F) muestra los resultados del ensayo de la luciferasa por el que se evaluó el efecto de inhibición de la variante de ERAP1-delecionada en la actividad transcripcional de ER α . Células COS-7 se transfectaron con Δ ERAP1, ERAP1 de longitud completa, PHB2, ER α y cada plásmido de un vector de ERE-luciferasa. Al mismo tiempo, las células se estimularon con E2 1 μ M durante 48 horas. Los datos muestran los múltiplos cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01.

La figura 1-4 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 transcelular se une a PHB2, e inhibe la interacción entre ERAP1 y PHB2. (G) muestra el sitio de interacción estimado con el software PISVER y la secuencia de la construcción ERAP1 mutante. (+) en el software PISVER muestra un residuo de aminoácido que tiene 0,39 o más del umbral predeterminado, y los residuos de aminoácidos de cara en negrita representan residuos de aminoácidos que mostraron la puntuación más alta ($\geq 0,6$) con respecto a la interacción entre ERAP1 y PHB2. (H) muestra los sitios de unión PHB2-deducidos (Q165, D169, Q173) en la estructura tridimensional estimada de ERAP1. (I) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la región de unión de PHB2-en ERAP1.

La figura 1-5 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 transcelular se une a PHB2, e inhibe la interacción entre ERAP1 y PHB2. (J) muestra las secuencias del péptido ERAP-1, el péptido ERAP1-codificado y el péptido ERAP1-mutante. (K) es un diagrama que ilustra los efectos de inhibición del péptido ERAP1 en la interacción ERAP1-PHB2 en células MCF-7 (panel superior) y células KPL-3C (panel inferior). Las células MCF-7 o células KPL-3C se trataron con 10 μ M de péptido ERAP1 (Pep), el péptido ERAP1-codificado (Scr) o el péptido ERAP1-mutante (Mut). Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. El lisado celular de estas células se inmunoprecipitó con anticuerpos o IgG de conejo normal como se muestra en la figura. A continuación, se realizó la inmunotransferencia con un anticuerpo anti-ERAP1 o un anticuerpo anti-PHB2.

La figura 2 es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la unión del péptido ERAP1 a PHB2. El lisado celular de las células COS-7 transfectadas temporalmente con el plásmido ERAP1 marcado con Flag se incubó durante 1 hora junto con proteína PHB2 recombinante 6xHis-marcado (10 μ g) y péptido ERAP1, el péptido ERAP1-codificado, o el péptido ERAP1-mutante en cada concentración que se muestra en la figura. Entonces, His-PHB2 se sometió a desplegamiento con Ni-NTA agarosa (Ni-resina).

La figura 3-1 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con péptido ERAP1 promueve la translocación nuclear de PHB2. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se detectan las localizaciones de ERAP1 y PHB2. Fueron estimuladas células MCF-7 durante 24 horas con péptido ERAP1 10 μ M y/o E2 10 nM. Las células se fraccionaron en las mitocondrias, el citoplasma y en fracciones nucleares por centrifugación por gravedad específica. Después, cada fracción se sometió a análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-ERAP1 y un anticuerpo anti-PHB2. PRDX3, α/β -Tublin (Tublin) y lamin B son marcadores de las mitocondrias, citoplasma, y de las fracciones nucleares, respectivamente (panel superior). El contenido de proteína de cada fracción se evaluó con gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie (panel inferior). (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se detecta la localización intracelular de PHB2. Las células KPL-3C se trataron durante 24 horas con péptido ERAP1 10 μ M marcado con HA y/o E2 10 nM. Entonces, las células se fraccionaron en citoplasma y fracciones nucleares por centrifugación por gravedad específica. Después, cada fracción se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α , un anticuerpo anti-ERAP1 o un anticuerpo anti-PHB2. Entonces, la inmunotransferencia se realizó con cada anticuerpo que se muestra en la figura (un anticuerpo anti-ERAP1, un anticuerpo anti-RE α , un anticuerpo anti-PHB2 y un anticuerpo anti-HA (péptido)). α/β -tubulina (tubulina) y Lamin B son marcadores para fracciones del citoplasma y nucleares, respectivamente.

La figura 3-2 es un diagrama que ilustra el efecto de promoción de la translocación nuclear de PHB2 y el efecto de supresión de la activación transcripcional de RE por el tratamiento con péptido ERAP1. (C) ilustra imágenes representativas de las células inmunes teñidas, que muestra la localización de péptido ERAP1 (péptido ERAP1 HA-marcado) y PHB2. Las células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 HA-marcado 10 μ M durante 24 horas en presencia o en ausencia de E2 10 nM. Después de la inmovilización, las células se sometieron a tinción por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-HA, un anticuerpo anti-PHB2 y DAPI (para discriminar el núcleo). La flecha indica el péptido ERAP1 nuclear-translocado. (D) muestra los resultados del ensayo de la luciferasa por el que se evaluó el efecto de inhibición de péptido ERAP1. Las células MCF-7 transfectadas temporalmente con un vector indicador de ERE-luciferasa fueron tratadas con un péptido ERAP1 marcado con HA en las concentraciones que se muestran en la figura. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas.

TAM indica el tratamiento con tamoxifeno. Los datos muestran la relación cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 3-3 es un diagrama que ilustra los resultados del ensayo de la luciferasa por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1. Las células MCF-7 transfectadas temporalmente con un vector indicador ERE-luciferasa (E) o un vector indicador AP-1-luciferasa (F) fueron tratadas con el péptido ERAP1, el péptido codificado o el péptido mutante a las concentraciones mostradas en la figura. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. TAM indica el tratamiento con tamoxifeno. Los datos muestran la relación cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P <0,001; NS, no significativo.

La figura 3-4 es un diagrama que ilustra el efecto de supresión de la activación transcripcional de RE por tratamiento con péptido ERAP1 y de la reconstitución de un complejo de remodelación de la cromatina. (G) muestra los resultados del ensayo de la luciferasa por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1. Las células KPL-3C transfectadas temporalmente con un vector indicador ERE-luciferasa fueron tratadas con el péptido ERAP1 en las concentraciones mostradas en la figura. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. TAM indica el tratamiento con tamoxifeno. Los datos muestran la relación cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01; ***P <0,001. (H) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual la reconstitución del complejo de remodelación de la cromatina por la adición del péptido ERAP1 fue examinado. Las células KPL-3C se trataron durante 24 horas con el péptido ERAP1 y/o E2. Entonces, la fracción nuclear se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α o un anticuerpo anti-PHB2. Posteriormente, el inmunoprecipitado se sometió a análisis de inmunotransferencia utilizando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 4-1 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 promueve la translocación nuclear de PHB2. (A) El panel superior muestra imágenes representativas de las células inmunes teñidas, que muestra la localización intracelular de PHB2. Células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 μ M o péptido ERAP1-codificado. Posteriormente, las células fueron tratadas con E2 10 nM. Después de la inmovilización, las células se sometieron a tinción de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-PHB2 y DAPI (para discriminar el núcleo). La flecha muestra el PHB2 nuclear translocado. El panel inferior muestra los datos de análisis estadístico de la intensidad de la señal de PHB2 en el núcleo. Los datos muestran la relación cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de cuatro experimentos independientes. *P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 4-2 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 promueve la translocación nuclear de PHB2. (B) es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se detectó la localización intracelular de PHB2. Las células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 o el péptido ERAP1-codificado. Posteriormente inmediatamente, las células fueron tratadas con E2 10 nM. Las células se fraccionaron en el citoplasma y las fracciones nucleares después de 1 hora o 24 horas. Cada fracción se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α , un anticuerpo anti-ERAP1 o un anticuerpo PHB2. Además, la inmunotransferencia se realizó con cada anticuerpo que se muestra en la figura con respecto a la muestra obtenida. α/β -Tubulin (tubulina) y Lamin B son marcadores de las fracciones del citoplasma y nucleares, respectivamente.

La figura 4-3 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 promueve la translocación nuclear de PHB2. (C) y (D) son figuras que muestran los resultados del ensayo de luciferasa por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la actividad transcripcional de ER α . Células MCF-7 transfectadas temporalmente con un vector indicador de ERE-luciferasa (C) o un vector indicador de AP-1-luciferasa (D) fueron tratadas con el péptido ERAP1 a las concentraciones mostradas en la figura o con tamoxifeno 10 nM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Los datos muestran la relación cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 4-4 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 promueve la translocación nuclear de PHB2. (E) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra la conversión del complejo de remodelación de cromatina por el péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 10 nM durante 24 horas. Entonces, la fracción nuclear se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α o un anticuerpo anti-PHB2. Posteriormente, el inmunoprecipitado se sometió a análisis de inmunotransferencia utilizando los anticuerpos que se muestran en la figura. (F) muestra los resultados del ensayo de desacetilación de un complejo de remodelación de cromatina formado por tratamiento con péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 durante 24 horas. A continuación, el lisado celular se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-PHB2. Posteriormente, la actividad de HDAC en el inmunoprecipitado se midió con un kit disponible en el mercado. El extracto nuclear de las células HeLa y PBS se utilizó como control positivo (P) y como control negativo (N), respectivamente. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes.

La figura 4-5 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 promueve la translocación nuclear de PHB2. (G) muestra el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en la desregulación del RE α dependiente de E2. El tratamiento se

realizó con el péptido ERAP1 y/o E2 para los diferentes tiempos que se muestran en la figura. Entonces, el nivel de proteína y el nivel de ARNm para la expresión de RE α fueron obtenidos por transferencia Western (panel superior: Proteína) y RT-PCR semi-cuantitativa (panel inferior: ARNm), respectivamente. La β -actina es un control de carga para cada uno. (H) muestra los efectos del péptido ERAP1 en la poliubiquitinación de RE α . Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 en presencia de MG-132 1 μ M durante 1 hora. A continuación, el lisado celular se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Entonces, el análisis de inmunotransferencia se realizó usando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 5 es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluaron los efectos del péptido ERAP1 en la regulación a la baja por poliubiquitinación de RE α y la descomposición del proteasoma. El panel superior y el panel inferior muestran los resultados obtenidos por los procedimientos descritos a continuación. Es decir, las células KPL-3C fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 10 nM durante 1 hora. Entonces, el nivel de proteína y el nivel de ARNm de RE α se examinaron mediante transferencia Western y RT-PCR semi-cuantitativa. Los resultados del mismo se muestran en el panel superior. La β -actina es un control de carga. Luego, las células KPL-3C fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 en presencia de MG-132 1 μ M durante 1 hora. A continuación, el lisado celular se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Posteriormente, el análisis de inmunotransferencia se realizó usando los anticuerpos que se muestran en la figura. Los resultados del mismo se muestran en el panel inferior.

La figura 6-1 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la proliferación de células dependiente de RE α de líneas celulares de cáncer de mama. (A) y (B) muestran los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en la proliferación celular dependiente de E2. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 (A, B), el péptido ERAP1-codificado (B) o el péptido ERAP1-mutante (B). Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM para los diferentes tiempos que se muestran en la figura (A) o durante 24 horas (B). Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P <0,001; NS, no significativo. (C) muestra los resultados del ensayo de MTT que muestra que la péptido ERAP1 no tuvo efecto sobre la proliferación de células epiteliales mamarias RE α /ERAP1-negativo, MCF-10A. Las células se trataron durante 24 horas con el péptido ERAP1 en las concentraciones mostradas en la figura, y se evaluó la proliferación celular.

La figura 6-2 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la proliferación de células dependientes de RE α de líneas celulares de cáncer de mama. (D) muestra los resultados del análisis de FACS que muestra los efectos del péptido ERAP1 sobre el ciclo celular. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M o tamoxifeno 10 nM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Después de la inmovilización, las células se tiñeron con yoduro de propidio, y se analizaron por citometría de flujo.

La figura 6-3 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la proliferación de células dependientes de RE α de líneas celulares de cáncer de mama. (E) muestra los resultados de la PCR en tiempo real por el que se evaluaron los efectos del péptido ERAP1 en la expresión génica. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 según se describió anteriormente. Después de la extracción de RNA y la síntesis de ADNc, se evaluó la expresión de genes. Los datos muestran la relación cuando el valor a 0 horas fue designado como 1,0, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 7-1 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la proliferación de células dependientes de RE α de líneas celulares de cáncer de mama. (A) muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la proliferación de las células KPL-3C. Células KPL-3C fueron tratadas con el péptido ERAP1, el péptido codificado o el péptido mutante. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P <0,001; NS, no significativo. (B) muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el tratamiento a largo plazo con el péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 a las concentraciones mostradas en la figura. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM. Después, se añadió el péptido ERAP1 cada día durante cuatro días. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. La flecha indica la adición del péptido ERAP1.

La figura 7-2 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la proliferación de células dependiente de RE α de líneas celulares de cáncer de mama. (C) muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la proliferación celular de líneas celulares de cáncer de mama RE α /ERAP1-positivo. Varias líneas de células de cáncer de mama RE α /ERAP1-positivo mostradas en la figura se trataron con 10 μ M del péptido ERAP1 o el péptido codificado o tamoxifeno 10 nM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 7-3 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la proliferación de células dependientes de RE α de líneas celulares de cáncer de mama. (D) muestra los resultados del ensayo de MTT y el ensayo de luciferasa por el que se puso a prueba la estabilidad del péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM (cuadrado blanco).

Después, se añadió el péptido ERAP1 10 μ M cada día durante cuatro días (cuadrados en negro). Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes.

La figura 7-4 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la proliferación de células dependientes de RE α de líneas celulares de cáncer de mama. (E) muestra los resultados del análisis de FACS que muestran los efectos del péptido ERAP1 sobre el ciclo celular. Células KPL-3C se trataron con péptido ERAP1 10 μ M o tamoxifeno 10 nM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Después de la inmovilización, las células se tiñeron con yoduro de propidio, y se analizaron por citometría de flujo.

La figura 8-1 es un diagrama que ilustra el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en la expresión génica del gen diana RE. (A) muestra los resultados de la RT-PCR cuantitativa mediante la cual se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en el gen diana RE. Células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 mM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM para los tiempos mostrados en la figura. Después de la extracción de ARN y siguiente a la síntesis de ADNc, la expresión de los genes que se muestra en la figura se evaluó con RT-PCR cuantitativa.

La figura 8-2 es un diagrama que ilustra el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en la expresión génica del gen diana RE. (B) muestra los resultados de la RT-PCR cuantitativa que muestra los efectos del péptido ERAP1 en la expresión génica. Células KPL-3C fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 durante 24 horas. Después de la extracción de ARN y siguiente a la síntesis de ADNc, se evaluó la expresión de los genes. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 9-1 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la ruta de activación no genómica. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra las expresiones de los receptores de la membrana de los respectivos factores de crecimiento. El lisado celular de las líneas celulares de cáncer de mama ER-positiva que se muestran en la figura se sometió a análisis de inmunotransferencia utilizando los anticuerpos que se muestran en la figura. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluaron los efectos del péptido ERAP1 en la interacción entre RE α y IGF-1R β en células KPL-3C. Células KPL-3C fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 durante 24 horas. Entonces, la fracción nuclear se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Posteriormente, el análisis de inmunotransferencia se realizó usando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 9-2 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprime la ruta de activación no genómica. (C a E) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la fosforilación inducida por E2. Las células KPL-3C (C y D) o células BT-474 (E) fueron tratadas con el péptido ERAP1. Luego, inmediatamente, las células fueron tratadas con E2 10 nM para los tiempos mostrados en la figura. A continuación, los niveles de fosforilación de Akt (C), MAPK (C) y RE α (D y E) fueron evaluados con transferencia Western. Los niveles de fosforilación relativos se cuantificaron mediante análisis de densitometría, y se calculó la relación con el valor a 0 horas para las células no tratadas. Estos datos descritos anteriormente son ejemplos representativos de dos experimentos independientes.

La figura 10-1 muestra que el péptido ERAP1 regula la ruta de activación no genómica inducida por E2 a través de IGF-1R β y Shc. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en la interacción de ER-IGF-1R β . Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Entonces, la fracción de citoplasma se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Además, con respecto a la muestra obtenida, se realizó el análisis de inmunotransferencia usando los anticuerpos que se muestran en la figura. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en la interacción de ER α -PI3K. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Entonces, la fracción de citoplasma se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α o anticuerpo anti-PHB2. Además, con respecto a la muestra obtenida, el análisis de inmunotransferencia se realizó usando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 10-2 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 regula la ruta de activación no genómica inducida por E2 a través de IGF-1R β y Shc. (C) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la fosforilación inducida por E2. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 para los tiempos mostrados en la figura. A continuación, los niveles de fosforilación de Akt y MAPK se evaluaron mediante transferencia Western usando los anticuerpos que se muestran en la figura. (D) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en las interacciones de ER α -IGF-1R β , ER α -PI3K, ER α -EGFR y ER α -Her2 en células BT-474. Células BT-474 fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2 durante 24 horas. Entonces, la fracción de citoplasma se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Además, con respecto a la muestra obtenida, el análisis de inmunotransferencia se realizó usando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 10-3 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 regula la ruta de activación no genómica inducida por E2 a través de IGF-1R β y Shc. (E) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la fosforilación inducida por E2. Células BT-474 fueron

tratadas con el péptido ERAP1. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM para los tiempos mostrados en la figura. A continuación, los niveles de fosforilación de Akt y MAPK se evaluaron mediante transferencia Western. (F) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la fosforilación de RE α inducida por E2. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 o el péptido ERAP1-codificado. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM para los tiempos mostrados en la figura. Entonces, el nivel de fosforilación de RE α se evaluó mediante transferencia de Western usando los anticuerpos que se muestran en la figura. Los niveles de fosforilación relativos se cuantificaron mediante análisis de densitometría, y se calculó la relación con el valor a 0 horas en las células no tratadas. Estos datos descritos anteriormente son ejemplos representativos de tres experimentos independientes.

La figura 11-1 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 inhibe la proliferación tumoral en un ratón ortotópicamente transplantado con cáncer de mama humano. (A) y (B) muestran la influencia del péptido ERAP1 en el volumen del tumor. Células KPL-3 fueron trasplantadas por vía subcutánea en el cuerpo graso de la mama de ratón desnudo BALB/c. La prueba de tratamiento (5 individuos/grupo) se inició (día 0) cuando el volumen del tumor en ausencia de E2 alcanzó aproximadamente 50-80 mm³. El péptido ERAP1 (14, 35 y 70 mg/kg), el péptido codificado (14, 35 y 70 mg/kg) o tamoxifeno (4 mg/kg) se administró cada día mediante inyección intraperitoneal a un ratón canceroso ortotópicamente transplantado con tumor KPL-3C. Al mismo tiempo, se administró E2 (6 μ g/día) por vía subcutánea cada día. (A) muestra los resultados de la medida del tamaño del tumor durante 2 semanas. (B) muestra el volumen medio del tumor en el día 11 después del tratamiento con el péptido ERAP1.

La figura 11-2 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 inhibe la proliferación tumoral en un ratón ortotópicamente transplantado con cáncer de mama humano. (C) muestra ejemplos representativos del tumor KPL-3C heterotransplantado (panel superior) y el ratón (panel inferior) que se muestra en la figura el día 14 después del tratamiento.

La figura 11-3 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 inhibe la proliferación tumoral en un ratón ortotópicamente transplantado con cáncer de mama humano. (D) muestra el cambio del peso corporal medio del ratón tratados con el péptido ERAP1. (E) muestra los resultados de RT-PCR cuantitativa mediante la cual se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en el nivel de expresión de los genes diana de RE α representativos en el tumor. El ratón fue sometido a eutanasia el día 14, y se eliminó el tumor, y el nivel de expresión de los genes aguas abajo en cada tumor se obtuvo por RT-PCR cuantitativa. Los datos muestran la relación cuando el nivel de la expresión de los genes en el grupo no tratado fue designado como 1, y se muestra la media $\pm$ SE de cinco ratones. *P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 11-4 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 inhibe la proliferación tumoral en un ratón ortotópicamente transplantado con cáncer de mama humano. (F) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluaron los efectos del péptido ERAP1 en los niveles de fosforilación de diferentes proteínas de señal en los tumores.

La figura 12 es un diagrama que ilustra la influencia del péptido ERAP1-codificado en el volumen del tumor. El péptido ERAP1-codificado (14, 35 y 70 mg/kg) se administró cada día mediante inyección intraperitoneal a un ratón canceroso ortotópicamente transplantado con tumor KPL-3C.

La figura 13-1 es un diagrama que ilustra la regulación de retroalimentación positiva de la activación transcripcional de ERAP 1. (A) muestra los resultados de la RT-PCR cuantitativa en la que se evaluó la sobre regulación de ERAP1 por la estimulación de E2. Células MCF-7 se estimularon con E2 10 nM para los tiempos mostrados en la figura, y la expresión de ERAP1 se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa en el ARNm. Cada muestra se normalizó con el contenido de ARNm de β 2-MG, y el nivel de expresión relativa de ERAP1 fue representado por la relación cuando el valor a 0 horas para las células no tratadas fue designado como 1. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P <0,001. (B) muestra los resultados de la RT-PCR cuantitativa y las inmunotransferencias por las que se evaluó la influencia de tamoxifeno en la expresión de ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con tamoxifeno (TAM) en las concentraciones mostradas en la figura. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas, y el nivel de ARNm y el nivel de proteína de ERAP1 fueron obtenidos por RT-PCR cuantitativa (panel izquierdo) y transferencia Western (panel derecho). En la RT-PCR cuantitativa, los datos se estandarizaron con el contenido de β 2-MG, y se muestra con la relación cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1. En el análisis de transferencia Western, β -actina se utilizó como control de carga.

La figura 13-2 es un diagrama que ilustra la regulación de retroalimentación positiva de la activación transcripcional de ERAP. (C) muestra los resultados del ensayo de la luciferasa por el cual se evaluó la activación transcripcional de ERAP1 a través de la secuencia de ERE en el intrón. Células MCF-7 se transfectaron con un vector indicador de luciferasa que comprende una construcción que contiene el motivo conservado-ERE (TCCAGTTGCATTGACCTGA) (SEQ ID NO: 56) situado en el intrón 1 del gen ERAP1, un constructo que consiste en la secuencia aguas arriba que no contiene el motivo ERE, o una construcción que consiste en la secuencia aguas abajo que no contiene el motivo ERE (panel inferior). A continuación, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas, y se midió la actividad de luciferasa. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P <0,001. (D) muestra los resultados del ensayo ChIP mediante el cual se evaluó la activación transcripcional de ERAP1 a través

de la secuencia de ERE estimada en el intrón 1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M o el péptido codificado. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Se preparó la cromatina, y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos que se muestran en la figura. El análisis de inmunoprecipitación de la cromatina se realizó usando cebadores específicos para la región de ERE en el intrón de ERAP1. (E) muestra los resultados de la PCR a tiempo real por la que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la expresión de ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM para los tiempos mostrados en la figura. Después de la extracción de RNA y siguiente a la síntesis de ADNc, la expresión de ERAP1 se evaluó con la PCR a tiempo real. Los datos muestran la relación cuando el valor a 0 horas para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01; ***P <0,001.

La figura 14 es un diagrama que ilustra el efecto de supresión del péptido ERAP1 en las células MCF-7 resistentes a tamoxifeno. (A) muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la proliferación de las células MCF-7 resistentes a tamoxifeno. Las células MCF-7 resistentes a tamoxifeno fueron tratadas con el péptido ERAP1 a cada concentración (0, 5 y 10 mM). Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05; **P <0,01. (B) muestra los resultados de la transferencia Western en la que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 en las fosforilaciones de Akt y MAPK (panel superior) y RE α (S104/106, S118, S167, S305 y Y537) (panel inferior) en células MCF-7 resistentes a tamoxifeno (Tam-R MCF7) y células MCF-7 (MCF-7wt), que son las células originales, en presencia y en ausencia de E2.

La figura 15 es un diagrama que ilustra los efectos del péptido ERAP1 sobre las funciones celulares E2-independientes. (A) muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la proliferación de células MCF-7. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 en cada concentración (1, 3, 5 y 10 mM) o tamoxifeno 10 nM como un control positivo durante 24 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05; **P <0,01. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluaron los efectos del péptido ERAP1 en la interacción entre RE α y IGF-1R β o Shc. Células MCF-7 fueron estimuladas con tratamiento con péptido ERAP1 10 μ M sólo, tratamiento con E2 10 nM, o tratamiento con péptido ERAP1 10 μ M y de inmediato E2 10 nM durante 24 horas, y la fracción de citoplasma se aisló de cada una de las células tratadas. Entonces, la fracción de citoplasma se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Además, con respecto a la muestra obtenida, el análisis de transferencia Western se realizó utilizando los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 16 es un diagrama que ilustra la influencia del péptido ERAP1 sobre la proliferación de células de cáncer de mama independientes de E2. La figura 16 muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama ER α -positivas (MCF-7, KPL-3C, ZR-75-1 y T47D). Cada una de las células se trató con péptido ERAP1 10 mM durante 24 horas (MCF-7), durante 48 horas (KPL-3C) o durante 96 horas (ZR-75-1 y T47D). Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05; **P <0,01.

La figura 17 es un diagrama que ilustra la influencia de la caída de ERAP1 en el efecto de supresión sobre la proliferación de células de cáncer de mama por el tamoxifeno. (A) muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición de tamoxifeno cuando ERAP1 fue deplecionado por el método de siRNA. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05; **P <0,01. (B) muestra los resultados del ensayo de luciferasa de ERE por el que se evaluó el efecto de inhibición de tamoxifeno cuando ERAP1 fue deplecionado por el método de siRNA. Los datos muestran la relación cuando el valor del si-control para las células no tratadas fue designado como 1, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes.

La figura 18 es un diagrama que ilustra la influencia del uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno sobre la proliferación de tumor en un ratón trasplantado con cáncer de mama humano. Células KPL-3 fueron trasplantadas por vía subcutánea en el cuerpo graso de la mama de ratón desnudo BALB/c. La prueba de tratamiento (5 individuos/grupo) se inició (día 0) cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 50 a 80 mm³, en ausencia de E2. (A) muestra ejemplos representativos de tumor ortotópicamente trasplantado con KPL-3C (panel superior) y de ratón (panel inferior) en el día 14 después de la iniciación de prueba. (B) muestra el volumen medio del tumor en el día 14 después de la iniciación de prueba.

La figura 19 es un diagrama que ilustra los resultados del análisis FACS que muestra los efectos del uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno sobre el ciclo celular.

La figura 20 es un diagrama que ilustra los resultados de las evaluaciones de la influencia de la diferencia de la secuencia en el efecto de supresión de la proliferación celular dependiente de E2. El panel superior muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluó el efecto de inhibición de 2 clases de los péptidos (el péptido ERAP1 y el péptido ERAP1-2) sobre la proliferación de células MCF-7 dependientes de E2. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 o péptido ERAP1-2 en las concentraciones mostradas en la figura. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 durante 24 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05; ***P <0,001. El panel inferior muestra las secuencias del péptido ERAP1 y

el péptido ERAP1-2. La secuencia adjunta muestra la región para la interacción con PHB2 que se estima por el software PISVER.

La figura 21 es un diagrama que ilustra que PHB2 se trans-localiza en el núcleo por la estimulación de E2 en líneas celulares de cáncer de mama ERAP1-negativas, células HCC1395. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se detectó la localización de PHB2. Células HCC1395 fueron tratadas con péptido ERAP1 5 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 1 μ M durante 24 horas. Las células se fraccionaron en el citoplasma y las fracciones nucleares por centrifugación con gravedad específica. Después, cada fracción se sometió a análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-PHB2. Lamin y tubulina son marcadores de las fracciones del citoplasma y nucleares, respectivamente. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se examinó la reconstitución del complejo de cromatina centrado en el ER α . Células HCC1395 fueron tratadas con péptido ERAP1 5 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 1 μ M durante 24 horas. Entonces, la fracción nuclear se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Además, con respecto a la muestra obtenida, el inmunoprecipitado se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (C) muestra los resultados del ensayo de MTT por el que se evaluaron los efectos del péptido ERAP1 sobre la proliferación de células HCC1395 de líneas celulares de cáncer de mama ERAP1-negativas. Células HCC1395 fueron tratadas con el péptido ERAP1 en las concentraciones mostradas en la figura. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 96 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05; NS, no significativo.

La figura 22 es un diagrama que ilustra que la fosforilación de serina PHB2 regula la actividad transcripcional de ER α . (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la influencia del tratamiento con el péptido ERAP1 en la fosforilación de PHB2 unido a ER α . Células MCF-7 y células HCC1395 fueron tratadas con péptido ERAP1 5 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 1 μ M durante 24 horas. Entonces, la fracción nuclear de cada célula se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE α . Además, con respecto a la muestra obtenida, el análisis de inmunotransferencia se realizó usando los anticuerpos que se muestran en la figura y el anticuerpo de fosforilación. (B) muestra los resultados del ensayo de la luciferasa por el cual se evaluó la regulación de la activación transcripcional de RE α por el residuo de serina en la posición 39 de PHB2. Células COS-7 transfectadas temporalmente con PHB2 (o vectores de mutación de PHB2, S39A y S39G), RE α , vector ERE-luciferasa, y cada plásmido de pRL-TK como un estándar interno se estimularon con E2 1 μ M durante 48 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01.

La figura 23 es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra expresiones de ERAP1, PHB2, y RE1 α en líneas celulares de cáncer de mama humano. Los lisados celulares de las líneas celulares de cáncer de mama humano y células epiteliales mamarias (MCF-10A) que se muestran en la figura se sometieron a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 24 es un diagrama que ilustra las expresiones de ERAP1 en especímenes de cáncer de mama humano extirpados. (A) muestra los resultados de la tinción de tejidos inmunes en los que se evaluó la expresión de ERAP1 para los especímenes de cáncer de mama extirpados. El panel superior ilustra imágenes representativas de los tejidos inmunes teñidos en especímenes de cáncer de mama extirpados embebidos en parafina que muestran la expresión de ERAP1. El juicio de la capacidad de tinción de parte del cáncer por inmunotinción se realizó tal que se determinó negativo en el caso de que el tejido de cáncer no se tiñera en absoluto (negativo: 24 casos, 23%), un caso en el que el citoplasma fue ligeramente teñido se determinó débil positivo (débil: 59 casos, 57%), y un caso en el que el tejido canceroso fue casi uniformemente fuertemente teñido se determinó como positivo fuerte (fuerte: 20 casos, 19%). El panel inferior es una curva de la supervivencia sin recaída construida para la correlación entre la expresión de ERAP1 y el período de supervivencia sin recaída con el método de Kaplan-Meier cuando los respectivos casos fueron clasificados de débil (casos negativos y casos positivos débiles) y fuerte (casos positivos fuertes). (B) muestra las imágenes representativas de tinción de los tejidos inmunes en las que se evaluó la expresión de PHB2 para los especímenes de cáncer de mama extirpados.

La figura 25 es un diagrama que ilustra los resultados de las evaluaciones para la influencia de la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA en la actividad transcripcional de RE α . (A) muestra los resultados del ensayo de la luciferasa por el que se evaluó el efecto de inhibición de PHB2/REA (Ser39) para la fosforilación en la actividad transcripcional de RE α . Células HEK293T fueron transfectadas temporalmente con REA de longitud completa (WT) y una construcción en la que Ser en la posición 39 se mutó a Ala o Glu (S39A y S39E), junto con un vector indicador de ERE-luciferasa y una construcción de RE α . Las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia de la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA. Células HEK293T fueron transfectadas con un constructo de PHB2/REA (WT, S39A y S39E). Después de 48 horas, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron. Entonces, el PHB2/REA HA-marcado se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-HA. Además, con respecto a la muestra obtenida, la proteína inmunoprecipitada se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de dos experimentos independientes. (C) muestra que Ser39 de PHB2/REA suprime la ruta de activación no genómica. Células HEK293T fueron transfectadas con un constructo PHB2/REA (WT, S39A y S39E). Después de 48 horas, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A

continuación, el lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de dos experimentos independientes.

La figura 26-1 es un diagrama que ilustra los resultados de las evaluaciones para la fosforilación en Ser39 translocado nuclear de PHB2/REA. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó la fosforilación del PHB2/REA nuclear translocado (Ser39) por el péptido ERAP1 transcelular. Células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Las células se fraccionaron en las fracciones del citoplasma y nucleares por centrifugación por gravedad específica. Después, cada fracción se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-PHB2/REA. A continuación, las células se lisaron. Entonces, la proteína inmunoprecipitada y el lisado de células se sometieron a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia sucesivo por el que se evaluó la fosforilación de serina de PHB2/REA separados por el tratamiento con el péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon temporalmente con E2 10 nM. Cada lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-PHB2/REA y un anticuerpo anti-fosforilación PHB2/REA (S39). (C) muestra imágenes de inmunotinción de células representativas que muestran la fosforilación de REA (S39). Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 y λ -fosfatasa (400 U) en presencia de E2 10 nM durante 24 horas. Después de la inmovilización, las células se sometieron a tinción de inmunofluorescencia.

La figura 26-2 es un diagrama que ilustra los resultados de las evaluaciones para la fosforilación en el Ser39 nuclear-translocado de PHB2/REA. (D) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la fosforilación de PHB2/REA (Ser39) nuclear-translocado por la supresión para la expresión de ERAP1. Células MCF-7 suprimidas para la expresión de ERAP1 por el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Entonces, las células se fraccionaron en la fracción de citoplasma (C) y en la fracción nuclear (N) por centrifugación por gravedad específica. Después, cada fracción se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (E) muestra los resultados de la PCR a tiempo real por la que se evaluaron las expresiones de los genes aguas abajo de RE α por la supresión para la expresión de ERAP1. Células MCF-7 suprimidas para la expresión de ERAP1 por el método de siRNA se trataron con péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Después de la extracción con ARN y la siguiente síntesis de ADNc, las expresiones de genes agua debajo de RE α (ERAP1, CCND1, TFF1 y c-Myc) fueron evaluadas con la PCR a tiempo real. Los datos muestran la relación cuando el valor para las células no tratadas fue designado como 1,0, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01, ***P <0,001.

La figura 27 es un diagrama que ilustra el efecto de inhibición del péptido ERAP1 sobre la proliferación de tumor en un ratón ortotópicamente transplantado con cáncer de mama humano. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que la fosforilación de PHB2/REA (Ser39) se evaluó en el tumor trasplantado de un ratón ortotópicamente transplantado con cáncer de mama humano al que se administró el péptido ERAP1. Células KPL-3 fueron trasplantadas por vía subcutánea en el cuerpo graso de la mama de un ratón desnudo BALB/c. La prueba de tratamiento (5 individuos/grupo) se inició (día 0) cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 50-80 mm³, en ausencia de E2. Para un ratón canceroso ortotópicamente transplantado con tumor KPL-3C, el péptido ERAP1 (péptido: 14 mg/kg) o el péptido ERAP1-codificado (Péptido scr: 14 mg/kg) se administró cada día mediante inyección intraperitoneal. Al mismo tiempo, se administró E2 (6 μ g/día) por vía subcutánea cada día. En el día 14, el ratón fue sacrificado, y se eliminó el tumor, y la fosforilación de PHB2/REA (S39) en cada tumor se evaluó con análisis de inmunotransferencia. (B) muestra los resultados de las evaluaciones para el volumen del tumor en un ratón trasplantado con cáncer de mama resistente a tamoxifeno al que se administró el péptido ERAP1. Las células MCF7 resistentes a tamoxifeno (Tam-R MCF-7) se trasplantaron por vía subcutánea en el cuerpo graso de la mama de un ratón desnudo BALB/c, y la prueba de tratamiento (5 individuos/grupo) se inició (día 0) cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 50-80 mm³, en presencia de tamoxifeno (37 ng/día, 1,85 μ g/kg). Para un ratón canceroso ortotópicamente transplantado con tumor Tam-R MCF-7, el péptido ERAP1 (péptido: 3,5, 7 y 14 mg/kg) o el péptido ERAP1-codificado (Péptido scr: 14 mg/kg) se administró cada día por inyección intraperitoneal. Al mismo tiempo, se administró E2 (6 μ g/día) por vía subcutánea cada día. El tumor Tam-R MCF-7 heterotransplantado en el día 21 y el volumen medio del tumor $\pm$ SE (n = 5) se muestran. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001.

La figura 28-1 es un diagrama que ilustra que ERAP1 y PP1 α interactúan entre sí. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra la unión de ERAP1 a PP1 α . Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron. Entonces, ERAP1 se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-ERAP1. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de tres experimentos independientes. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual la región de unión de PP1 α se confirmó en ERAP1. Células HEK293T fueron transfectadas con un constructo de ERAP1 (Δ PP1 α) en el que 1228-1232 aa (KAVSF), es decir, el motivo de unión de PP1 α deducido se eliminó, y una construcción de RE α . Después de 48 horas, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron. Entonces, ERAP1 marcado con FLAG se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con anticuerpo anti-

FLAG. Además, la proteína inmunoprecipitada se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de dos experimentos independientes.

La figura 28-2 es un diagrama que ilustra que ERAP1 y PP1 α interactúan entre sí. (C) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que ERAP1, PHB2/REA y RE α forman un complejo por la supresión de la expresión de PP1 α . Células MCF-7 suprimidas para la expresión de PP1 α por el método de siRNA se trataron con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Las células se fraccionaron en las fracciones del citoplasma y nucleares por centrifugación por gravedad específica. Después, cada fracción se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RE. A continuación, las células se lisaron. Entonces, la proteína inmunoprecipitada y el lisado de células se sometieron a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (D) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que PP1 α se une indirectamente a PHB2/REA a través de ERAP1. Células MCF-7 suprimidas para la expresión de ERAP1 por el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Entonces, las células se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-PHB2/REA y un anticuerpo IgG. A continuación, las células se lisaron. Entonces, la proteína inmunoprecipitada y el lisado de células se sometieron a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 29 es un diagrama que ilustra que la inhibición de la unión de ERAP1 a PP1 α induce la fosforilación de PHB2/REA (S39). (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la influencia de la supresión de la expresión de PP1 α sobre la fosforilación de PHB2/REA (Ser39). Células MCF-7 en las que la expresión de PP1 α fue suprimida por el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron. Entonces, ERAP1 se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-ERAP1. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de tres experimentos independientes. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que la fosforilación de PHB2/REA (Ser39) en células tratadas con ERAP1, en las que se elimina la región de unión de PP1 α , fue evaluada. Células HEK293T fueron transfectadas con el constructo ERAP1 (1228-1232 aa)-eliminado del motivo de unión de PP1 α (Δ PP1 α), y una construcción de RE α . Después de 48 horas, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Las células se lisaron, y luego PHB2/REA se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-PHB2/REA. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de dos experimentos independientes. (C) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el que la fosforilación de PHB2/REA (Ser39) se evaluó en las células tratadas con el péptido de inhibición de unión ERAP1-PP1 α . Células MCF-7 fueron tratadas con 50 y 100 μ M del péptido de inhibición. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Estos lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-ERAP1. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 30-1 es un diagrama que ilustra que la fosforilación de ERAP1 induce la actividad de fosfatasa de PP1 α . (A) muestra los resultados de la prueba de siRNA que muestran que ERAP1 regula negativamente la actividad de PP1 α . Se lisaron las células MCF-7 en las que la expresión de ERAP1 o PP1 α fue suprimida por el método de siRNA. Entonces, se calculó la actividad de fosfatasa del lisado celular obtenido. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P < 0,001. (B) muestra los resultados del análisis de actividad de la fosfatasa y el análisis de inmunotransferencia por el que se evaluó el efecto de inhibición de ERAP1 sobre la actividad de PP1 α . Células HEK293T fueron transfectadas con un constructo de ERAP1 (0,5, 1,0 y 2,0 μ g) o el constructo de ERAP1 eliminada la región de unión de PP1 α (Δ PP1 α : 2,0 μ g), y se lisaron. A continuación, el lisado celular se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-PP1 α . Además, con respecto a la muestra obtenida, se realizaron el análisis de la actividad de la fosfatasa (panel superior) y el análisis de inmunotransferencia (panel inferior). La actividad de fosfatasa muestra la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P < 0,01, ***P < 0,001.

La figura 30-2 es un diagrama que ilustra que la fosforilación de ERAP1 induce la actividad de fosfatasa de PP1 α . (C) muestra los resultados del ensayo de fosfatasa que muestra que la estimulación de estrógenos induce la actividad de PP1 α . Células MCF-7 se estimularon con E2 10 nM de 6, 12 o 24 horas. Entonces, se calculó la actividad de fosfatasa del lisado celular. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P < 0,001. (D) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la fosforilación de ERAP1 por la estimulación de estrógenos. Células MCF-7 se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, el lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos anti-fosforilación que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de tres experimentos independientes. (E) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra la unión de ERAP1 para PKA y PKB. Células MCF-7 se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron. A continuación, el lisado celular se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-ERAP1 y un anticuerpo IgG. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos son ejemplos representativos de tres experimentos independientes.

La figura 31-1 es un diagrama que ilustra que la fosforilación de ERAP1 por PKA y PKB regula la fosforilación de PHB2/REA (S39) a través de la actividad de PP1 α . (A) muestra los resultados del ensayo de fosfatasa mostrando

que PKA y PKB causan la actividad de PP1 α . Células MCF-7 suprimidas para la expresión de PKA o PKB, o ambos de PKA y PKB por el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Entonces, la solución del lisado de células se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-ERAP1. Además, se calculó la actividad de la fosfatasa de la muestra obtenida. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01, ***P <0,001. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que PKA y PKB causa la fosforilación de ERAP1. Células MCF-7 suprimidas para la expresión de PKA o PKB, o ambos de PKA y PKB por el método de siRNA, fueron tratados con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, el lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos muestran la relación cuando el valor de la fosforilación por la estimulación de E2 en las células tratadas con siControl fue designado como 1.0, y son ejemplos representativos de tres experimentos independientes. (C) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestran que la inhibición de la actividad de PKA por H-89 regula la fosforilación de ERAP1 y PHB2/REA. Células MCF-7 fueron tratadas con H-89 durante 30 minutos y se lavaron con PBS. A continuación, las células se trataron con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, el lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 31-2 es un diagrama que ilustra que la fosforilación de ERAP1 por PKA y PKB regula la fosforilación de PHB2/REA (S39) a través de la actividad de PP1 α . (D) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que la fosforilación de serina de ERAP1 es suprimida por la inhibición de la actividad de PKA y que la fosforilación de PHB2/REA (S39) es causada. Células MCF-7 suprimidas para la expresión de PKA mediante el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Además, células MCF-7 se trataron con H-89 durante 30 minutos y se lavaron con PBS. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, el lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (E) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestran que la inhibición de la actividad de PKA provoca la fosforilación de PHB2/REA (S39). Células MCF-7 fueron tratadas con H-89 y ácido ocaídoico durante 30 minutos y se lavaron con PBS. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, el lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (F) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que el PKC α provoca la fosforilación de REA (S39). Células MCF-7 suprimidas para la expresión de PKC α por el método de siRNA se trataron con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Las células se fraccionaron en las fracciones del citoplasma y nucleares por centrifugación por gravedad específica. Después, cada fracción se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos muestran la relación cuando el valor de la fosforilación de REA de las células tratadas con siControl y tratadas con péptido ERAP1 fue designado como 1,0.

La figura 32 es un diagrama ilustrativo de que PP1 α es un gen diana de RE α . (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la sobre regulación de PP1 α por la estimulación de E2. Células MCF-7 y células BT-474 se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas, y el nivel de proteína de PP1 α se evaluó por análisis de transferencia Western. Los datos fueron normalizados con β -actina. (B) muestra los resultados de la PCR a tiempo real por el cual se evaluó la sobre regulación de PP1 α por la estimulación de E2. Células MCF-7, células ZR-75-1, células T47D y células BT-474 se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas, y el nivel de ARNm de PP1 α se obtuvo con la PCR a tiempo real. Los datos están normalizados con el contenido de β 2-MG, y muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. **P <0,01, ***P <0,001. (C) muestra el motivo conservado-ERE situado en el 5' aguas arriba y el intrón 2 del gen PP1 α estimado por el software Genomatix (Genomatix Software, Munich, Alemania). (D) muestra los resultados del chip de ensayo mediante el cual se evaluó la trans-activación de PP1 α a través de la secuencia de ERE de 5' aguas arriba y el intrón 2. Células MCF-7 se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas, y a continuación, la cromatina se preparó, y se inmunoprecipitó con los anticuerpos que se muestran en la figura. El análisis de inmunoprecipitación de la cromatina se realizó usando cebadores específicos para la región ERE de 5' aguas arriba y el intrón 2 de PP1 α . (E) muestra los resultados del ensayo de luciferasa por el cual se evaluó la trans-activación de PP1 α a través de la secuencia de ERE en el gen PP1 α . Células HEK293T fueron transfectadas con un vector indicador de luciferasa que consta de una construcción que comprende el motivo conservado-ERE situado en el 5' aguas arriba y el intrón 2 del gen PP1 α (el panel inferior: 5'-ERE y 5'- y el intrón 2-ERE). A continuación, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas, y se midió la actividad de luciferasa. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. ***P <0,001.

La figura 33 es un diagrama que ilustra que el tratamiento con el péptido ERAP1 suprimía la aceleración de las expresiones de proteínas y genes por la estimulación de estrógenos. (A) muestra los resultados del análisis estadístico de proteomas en las células tratadas con el péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M (péptido) y el péptido ERAP1-codificado (Péptido scr). Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 1 hora. Posteriormente, la solución del lisado de células obtenida se digirió con tripsina y se sometió a 2DICAL. Los datos se calcularon como la relación con el valor a 0 horas, y cada proteoma se analizó estadísticamente con el diagrama de caja. *P <0,05. (B) muestra los resultados del análisis estadístico de la transcriptoma en las células tratadas con el péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 5, 10 y 15 horas. A continuación, se realizaron la extracción de ARN y luego la síntesis de Cy3-ARNc y el Cy3-ARNc se sometió a los microarrays.

Los datos se analizaron estadísticamente por el software GeneSpring, y se calculó la relación con el valor en 0 horas. **P <0,01.

La figura 34 es un diagrama que ilustra que el péptido ERAP1 se une específicamente a PHB2/REA. (A) muestra los resultados de las evaluaciones para la unión del péptido de ERAP1 a PHB2/REA por Biacore. La proteína PHB2/REA recombinante 6xHis-marcada se inmovilizó sobre un chip sensor, y después se hizo reaccionar con un péptido ERAP1 HA-marcado a las concentraciones mostradas en la figura, y la constante de velocidad de disociación (Kd) se calculó a partir de la curva del sensograma. (B) muestra los resultados de las evaluaciones para la unión de PHB2/REA al péptido ERAP1 por el método de espectroscopia por correlación de fluorescencia. El péptido ERAP1 (péptido) 10 nM marcado con FITC, el péptido ERAP1-codificado (Péptido scr) FITC-marcado y la proteína PHB2/REA recombinante 6xHis-marcada en las diversas concentraciones que se muestran en la figura se hicieron reaccionar durante 1 hora. A continuación, se midió la fluorescencia FITC de la muestra.

La figura 35 es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal anti-ERAP1. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que ERAP1 se detectó específicamente con el anticuerpo purificado anti-ERAP1. Se lisaron las células MCF-7 suprimidas para la expresión de ERAP1 por el método de siRNA. Entonces, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de ERAP1 humano (459-572 aa). (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la coprecipitación de PHB2/REA por el anticuerpo purificado anti-ERAP1. Los lisados de células MCF-7 (M) y células T47D (T) se inmunoprecipitaron con el anticuerpo purificado anti-ERAP1. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura.

La figura 36 es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que un anticuerpo PHB2/REA (S39) anti-fosforilación detecta específicamente la fosforilación de Ser39 de PHB/REA. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. El lisado celular obtenido se sometió a análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo PHB2/REA (S39) anti-fosforilación, un anticuerpo de serina anti-fosforilación y un anticuerpo anti-PHB/REA.

La figura 37 es un diagrama que ilustra los resultados de las evaluaciones de la estabilidad del péptido ERAP1 y la influencia del péptido ERAP1 en el E2 celular. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se evaluó la estabilidad del péptido ERAP1. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 marcado con HA 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon temporalmente con E2 10 nM. A continuación, el lisado celular se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos están normalizados con β -actina, y muestran la relación cuando el valor en 1 hora (n = 1, 3) o a las 3 horas (n = 2) se designa como 100. (B) muestra los resultados de las evaluaciones para la influencia del péptido ERAP1 en la concentración de E2 celular. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 mM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon temporalmente con E2 10 nM. El lisado celular se centrifugó, y luego el sobrenadante y un precipitado lisado con metanol se mezclaron (concentración final de metanol: 10%), y la concentración de E2 celular se midió con un kit disponible comercialmente (kit ELISA de 17 β -estradiol, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes.

La figura 38 es un diagrama que ilustra los resultados del análisis de inmunotransferencia por el cual se identificó un aminoácido en ERAP1 que se une a PHB. Células COS-7 se transfectaron con el constructo de PHB2 junto con uno cualquiera de ERAP1 (1-434 aa), un mutante de alanina de Q165, D169 y Q173, un mutante de alanina de Q165 (Q165A), un mutante de alanina de D169 (D169A), un mutante de alanina de Q173 (Q173A) o un mutante de alanina de Q165 y D169 (Q165A, D169A). Las células se lisaron después de 48 horas de la transfección. Entonces, las células se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-FLAG y un anticuerpo anti-HA. La proteína inmunoprecipitada y el lisado de células se sometieron a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Los datos muestran la relación cuando la banda de coprecipitación con ERAP1 (1-434 aa) se designa como 100.

La figura 39 es un diagrama que ilustra que la fosforilación de ERAP1 por PKA y PKB regula la fosforilación de PHB2/REA (S39) a través de la actividad de PP1 α en las células KPL-3C. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que PP1 α regula la fosforilación de la serina de PHB2/REA. Células KPL-3C suprimidas para la expresión de ERAP1 y PP1 α por el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron. ERAP1 se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-ERAP1. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (B) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que PKA y PKB causan la fosforilación de ERAP1. Células KPL-3C suprimidas para la expresión de PKA y PKB por el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron. Entonces, ERAP1 se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-ERAP1. Además, la muestra obtenida se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. (C) muestra los resultados del ensayo de fosfatasa que muestra que PKA y PKB causan la actividad de PP1 α . Células KPL-3C suprimidas para la expresión de ERAP1, PP1 α , PKA y PKB por el método de siRNA se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. A continuación, el lisado celular se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-ERAP1. Además,

con respecto a la muestra obtenida, se calculó la actividad de fosfatasa. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes.

La figura 40 es un diagrama que ilustra los resultados de ensayo de MTT por el cual se evaluó el efecto de supresión de la proliferación del péptido ERAP1 en líneas celulares de cáncer de mama RE α negativas, células SK-BR-3. Células SK-BR-3 fueron tratadas con el péptido ERAP1 (péptido) o el péptido ERAP1-codificado (Péptido scr) durante 24 horas o durante 48 horas. Los datos muestran la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes. *P <0,05, ***P <0,001.

La figura 41-1 es un diagrama que ilustra que la producción de ROS en las mitocondrias por la estimulación con E2 se induce a través de ERAP1. (A) muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia que muestra que ERAP1 fue localizado en las mitocondrias. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Las células se fraccionaron en la fracción de mitocondrias (M), la fracción del citoplasma (C) y la fracción nuclear (N) por centrifugación por gravedad específica. Después, cada fracción se sometió a análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos que se muestran en la figura. Lamin B, α/β -tubulina (tubulina) y PRDX3 son marcadores para la fracción nuclear, la fracción de citoplasma y la fracción de mitocondrias, respectivamente.

La figura 41-2 es un diagrama que ilustra que la producción de ROS en la mitocondria por la estimulación con E2 se induce a través de ERAP1. (B) muestra los resultados de las evaluaciones para la producción de ROS mediante ERAP1 en la mitocondria. Células MCF-7, y las células MCF-7 suprimidas para la expresión de ERAP1, y células HCC1395 fueron tratadas con DHR123 10 μ M durante 15 minutos. Las células se lavaron, y después se estimularon con péptido ERAP1 10 μ M y E2 10 nM durante 24 horas, y se analizaron por citometría de flujo. Las células tratadas con H₂O₂ 1 mM durante 24 horas se utilizaron como control positivo. Los datos son ejemplos representativos de dos experimentos independientes.

Modos de llevar a cabo la invención

Definiciones

Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se puedan utilizar en la práctica o prueba de las realizaciones de la presente invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Sin embargo, antes de que se describan los presentes materiales y métodos, se ha de entender que la presente invención no se limita a los tamaños, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, y similares particulares que se describen en el presente documento, ya que estos pueden variar de acuerdo con la experimentación de rutina y la optimización. Es de entenderse también que la terminología usada en la descripción es para el propósito de describir las versiones o realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder dicha descripción en virtud de la invención anterior.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por cualquier experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá.

Las palabras "un", "uno", "una", y "el" y "la" como se usan en este documento significa "al menos uno" a menos que se indique otra cosa específicamente.

Los términos "aislado" y "purificado" que se utilizan en relación con una sustancia (por ejemplo, péptido o polinucleótido) indican que la sustancia está sustancialmente libre de al menos una sustancia que puede incluir otra cosa en la fuente natural. Por lo tanto, un péptido aislado o purificado se refiere a péptidos que están sustancialmente libres de materiales celulares tales como carbohidratos, lípidos, u otras proteínas contaminantes de la fuente de las células o el tejido del que se obtiene el péptido o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas de cuando se sintetizan químicamente. La expresión "sustancialmente libre de materiales de la célula" incluye preparaciones de un péptido en el que el péptido se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce recombinantemente.

Por lo tanto, un péptido que está sustancialmente libre de materiales celulares incluye preparaciones de un péptido que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga. Cuando el péptido se produce de forma recombinante, la preparación también está sustancialmente libre de medio de cultivo, e incluye preparaciones de un polipéptido con medio de cultivo contaminante que es menor que aproximadamente 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación del péptido en algunas realizaciones. Cuando el polipéptido se produce por síntesis química, la preparación está sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas, e incluye preparaciones de un péptido con precursores químicos u otras sustancias químicas que participan en la síntesis del péptido que es menor que aproximadamente 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso seco) del volumen de la preparación de péptidos en algunas realizaciones. En las realizaciones preferidas, el péptido de la presente invención es aislado o purificado.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan en este documento de forma intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son residuos modificados o residuos de origen no natural, por ejemplo, miméticos químicos artificiales de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de origen natural de aminoácidos.

El término "aminoácido" se usa en este documento para referirse a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Aminoácidos de origen natural pueden ser aquellos codificados por el código genético, así como los modificados después de la traducción en las células (por ejemplo, hidroxiprolina, ácido γ -carboxiglútamico, y O-fosfoserina). La expresión "análogo de aminoácido" se utiliza en este documento para referirse a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono α unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino, y un grupo R) como un aminoácido de origen natural, pero tienen un grupo R modificado o esqueletos modificados (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metil sulfonio). La expresión "mimético de aminoácido" se utiliza en este documento para referirse a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras, pero funciones similares, respecto a los aminoácidos generales.

Los aminoácidos pueden ser referidos en este documento con sus comúnmente conocidos símbolos de tres letras o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan en este documento de forma intercambiable para referirse a un polímero de nucleótidos. Estos términos incluyen tanto polímeros de ácido nucleico de origen natural como polímeros de ácido nucleico no naturales. Los nucleótidos se conocen por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptables como los aminoácidos.

El término "tratamiento" en el contexto de la presente invención significa la mejora de al menos un síntoma generado por una enfermedad objetivo o la supresión para el progreso de los síntomas. Ejemplo del "tratamiento del cáncer" incluye la inhibición de la proliferación de células cancerosas, la regresión del cáncer, la mejora detectable, el alivio o la supresión para el progreso de los síntomas implicados con el cáncer, y la supresión de la metástasis.

El término "prevención" en el contexto de la presente invención significa la evitación, la supresión o el retraso de la generación de una enfermedad objetivo. La prevención se puede realizar en los niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria. La prevención primaria es evitar la aparición de una enfermedad, y los niveles secundario y terciario de la prevención incluyen actividades con el fin de recuperar las funciones y la disminución de las complicaciones asociadas con una enfermedad, por lo tanto para evitar el progreso de la enfermedad y la aparición de los síntomas, y disminuir las influencias adversas de la enfermedad ya establecida. Los ejemplos de la "prevención del cáncer" incluyen la evitación o el retraso del brote de cáncer, la supresión o el retraso del progreso de los síntomas de un primer paso, y la supresión de la metástasis después de la cirugía.

En este documento, la expresión "polipéptido ERAP1" se refiere a un polipéptido codificado por el gen de ERAP1 (proteína regulada por la actividad del receptor de estrógenos 1). Más específicamente, el "polipéptido ERAP1" se refiere a una proteína ERAP1 humana, un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 35 (GeneBank nº de entrada BAH83562.1). Sin embargo, en la presente invención, el polipéptido ERAP1 no se limita al mismo, sino que también incluye isoformas y mutantes del mismo. "ERAP1" también se refiere a "BIG3 (proteína de intercambio de nucleótidos de guanina Brefeldina A-inhibida 3)", "A7322", o "KIAA1244". En este documento, el "polipéptido ERAP1" también se describe como "ERAP1". Un ejemplo de una secuencia de bases representativa de la secuencia del gen de ERAP1 humana se muestra en SEQ ID NO: 34 (GeneBank nº de entrada AB252196.1).

En este documento, la expresión "polipéptido PHB2" se refiere a un polipéptido codificado por el gen PHB2 (prohibitin2). Más específicamente, "polipéptido PHB2" se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 37 (GeneBank nº de entrada NP_001138303.1), que es la proteína PHB2 humana. Sin embargo, en la presente invención, el polipéptido PHB2 no se limita al mismo, sino que también incluye isoformas y mutantes del mismo. "PHB2" también se refiere como "REA (represor de la actividad de estrógenos)". En este documento, "polipéptido PHB2" también se describe como "PHB2" o "PHB2/REA". Un ejemplo de una secuencia de bases representativa del gen PHB2 humana se muestra en SEQ ID NO: 36 (GeneBank nº de entrada NM_001144831.1).

En este documento, la expresión "polipéptido PP1 α " se refiere a un polipéptido codificado por el gen de PPPCA (proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, alfa isoenzima). Más específicamente, "polipéptido PP1 α " se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 72, 74 ó 76 (GeneBank nº de entrada NP_001008709, NP_002699.1 o NP_996756.1), que es la proteína PP1 α humana. Sin embargo, en la presente invención, el polipéptido PP1 α no se limita al mismo, sino que también incluye isoformas y mutantes del mismo. En este documento, "polipéptido PP1 α " también se describe como "PP1 α ". Los ejemplos representativos de la secuencia de bases del gen PP1 α humano se muestran en SEQ ID NOs: 71, 73 y 75 (GeneBank números de entrada NM_001008709, NM_002708.3 y NM_206873.1).

En este documento, la expresión "polipéptido PKA" se refiere a un polipéptido codificado por el gen de PRKACA (proteína quinasa, dependiente de AMPc, catalítica, alfa). Más específicamente, el "polipéptido PKA" se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 78 o 80 (GeneBank nº de entrada NP_002721.1 o NP_997401.1), que es una proteína humana PKA (proteína quinasa A). Sin embargo, en la presente invención, el polipéptido PKA no se limita al mismo, sino que también incluye isoformas y mutantes del mismo. En este documento, el "polipéptido PKA" también se describe como "PKA". Los ejemplos representativos de la secuencia de bases del gen de PKA humano se muestran en SEQ ID NOs: 77 y 79 (GeneBank números de entrada NM_002730.3 y NM_207518.1).

En este documento, la expresión "polipéptido PKB" se refiere a un polipéptido codificado por el gen de AKT1 (homólogo del oncogén viral murino de timoma de v-akt 1). Más específicamente, el "polipéptido PKB" se refiere a la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 82, 84 ó 86 (GeneBank nº de entrada NP_001014431, NP_001014432 o NP_005154), que es la proteína humana PKB (proteína quinasa B). Sin embargo, en la presente invención, el polipéptido PKB no se limita al mismo, sino que también incluye isoformas y mutantes del mismo. "Polipéptido PKB" también se refiere a "PKB". Los ejemplos representativos de la secuencia de bases del gen de PKB humano se muestra en SEQ ID NOs: 81, 83 y 85 (GeneBank números de entrada NM_001014431, NM_001014432 y NM_005163).

La expresión "receptor de estrógenos" que se utiliza en este documento incluye tanto al receptor de estrógenos α (RE α) como al receptor de estrógenos β (RE β). RE α y RE β son codificados por los genes ESR1 y el gen ESR2, respectivamente. La secuencia de bases representativa del gen de ESR1 humano y la secuencia de aminoácidos de RE α humano se muestran en SEQ ID NO: 38 (GeneBank No. de entrada NM_000125.3) y SEQ ID NO: 39 (GeneBank No. de entrada NP_000116.2), respectivamente. Además, la secuencia de bases representativa del gen de ESR2 humano y la secuencia de aminoácidos de RE β humano se muestran en SEQ ID NO: 40 (GeneBank No. de entrada NM_001437.2) y SEQ ID NO: 41 (GeneBank No. de entrada NP_001428.1), respectivamente. Sin embargo, en la presente invención, la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos del receptor de estrógenos no están limitados a las mismas, sino que incluyen isoformas y mutantes de las mismas. En las realizaciones preferidas, el receptor de estrógenos es RE α . Se ha informado de que cualquiera de RE α y RE β está regulado por el polipéptido PHB2 con respecto a la activación de la transcripción (Montano MM, et al, Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 6947-52).

En este documento, la expresión "positivo para el receptor de estrógenos", que se usa con respecto a una célula o un cáncer, significa que una célula, o células cancerígenas que constituyen un cáncer, expresan un receptor de estrógenos. Si una célula o cáncer es positivo para el receptor de estrógenos se puede confirmar o no mediante un método conocido tal como el método ELISA y el método de tinción inmunohistoquímica. Además, en el presente documento, la expresión "negativo para el receptor de estrógenos", que se usa con respecto a una célula o un cáncer, significa que una célula, o células cancerígenas que constituyen un cáncer, no expresan un receptor de estrógenos.

1. Péptido ERAP1

La presente invención proporciona un péptido que inhibe la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, que comprende un sitio de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. El péptido de la presente invención en el presente documento también se describe como "péptido ERAP1".

El péptido de la presente invención tiene una capacidad para unirse al polipéptido PHB2 comprendiendo un sitio de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. Como consecuencia, el péptido de la presente invención inhibe de forma competitiva la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. El péptido ERAP1 de la presente invención puede ser una sal con tal de que tenga la acción de inhibir la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. Por ejemplo, el péptido ERAP1 de la presente invención puede ser una sal con un ácido (por ejemplo, ácido inorgánico o ácido orgánico) o una base (por ejemplo, metal alcalino, metal alcalino-térreo, o amina). Ejemplos de la sal con un ácido incluyen sales con un ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, o ácido acético) y sales con un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, o meglumina ácido). Ejemplos de la sal con una base incluyen sales con sodio, potasio, calcio y amonio. Los ejemplos preferidos de la sal del péptido de la presente invención incluyen la sal de ácido acético, sal de ácido clorhídrico, sal de ácido de meglumina, y la sal de amonio.

El sitio de unión al polipéptido PHB2 en el polipéptido ERAP1 significa un residuo de aminoácido que está implicado en la unión al polipéptido PHB2 en la secuencia de aminoácidos que constituye el polipéptido ERAP1. Ejemplos de tales residuos de aminoácidos incluyen la glutamina en la posición 165, el ácido aspártico en la posición 169, y la glutamina en la posición 173 en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 33. El péptido de la presente invención es un péptido que inhibe la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, que comprende la glutamina en la posición 165, el ácido aspártico en la posición 169 y la glutamina en la posición 173 en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 33. Además, en el presente documento, el número de residuos de aminoácidos particulares en la secuencia de aminoácidos representa el número de los residuos de aminoácidos contados a partir del extremo N-terminal.

En las realizaciones más preferidas, el péptido de la presente invención incluye la secuencia de aminoácidos desde la glutamina en la posición 165 a la glutamina en la posición 173 en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 33 (QMLSDDLTLQ (SEQ ID NO: 31)). Los ejemplos de tal péptido incluyen el péptido ERAP1 (QMLSDDLTLQLRQR (SEQ ID NO: 27)) y el péptido ERAP1-2 (ATLSQMLSDDLTLQ (SEQ ID NO: 30)) que se describe en los Ejemplos de la memoria descriptiva. Por lo tanto, los ejemplos preferidos del péptido de la presente invención incluyen péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en (a) a (c) que se describe a continuación:

(a) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 31/QMLSDDLTLQ;

(b) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 27/QMLSDDLTLQLRQR; y

(c) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 30/ATLSQMLSDDLTLQ.

Sin embargo, el péptido de la presente invención no está limitado al mismo, y la secuencia de aminoácidos que constituye el péptido no está particularmente limitada si la secuencia de aminoácidos comprende un sitio de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, y tiene una actividad de unión de inhibición del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, y es como se define en las reivindicaciones.

Se sabe que la alteración de uno o más aminoácidos en un péptido generalmente no tiene ninguna influencia sobre las funciones del péptido. En la práctica, se sabe que un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos son alterados por sustitución, delección, inserción y/o adición, mantiene las actividades biológicas del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6 (1984); Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 10: 6487-500 (1982); Dalbadie-McFarland et al, Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13 (1982)). Por lo tanto, el péptido de la presente invención incluye péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en de (a') a (c') que se describe a continuación, y que tienen una actividad de inhibir la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2:

(a') la secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos, además de la glutamina en la posición 1/Q, el ácido aspártico en la posición 5/D y la glutamina en la posición 9/Q están sustituidos con otros residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 31;

(b') la secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos, además de la glutamina en la posición 1/Q, el ácido aspártico en la posición 5/D y la glutamina en la posición 9/Q están sustituidos con otros residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 27; y

(c') la secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos, además de la glutamina en la posición 5/Q, el ácido aspártico en la posición 9/D y la glutamina en la posición 13/Q están sustituidos con otros residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 30.

Los residuos de aminoácidos sustituidos en los anteriormente mencionados de (a') a (c') pueden ser cualquier residuo de aminoácido, siempre y cuando sea mantenida la capacidad de inhibir la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. Los residuos de aminoácidos sustituidos pueden ser determinados mediante la estimación de los residuos de aminoácidos que no están implicados en la unión al péptido PHB2 utilizando un método de cálculo tal como PSIVER. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos estimados como "-" en la Fig. 1G se pueden seleccionar preferiblemente como un residuo candidato para la sustitución. El número de los residuos de aminoácidos sustituidos no está particularmente limitado también, siempre que se mantenga la capacidad de inhibir la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, y uno, dos o varios residuos de aminoácidos puedan ser sustituidos. El término "varios" es preferiblemente seis, cinco, cuatro o tres.

Por ejemplo, el péptido ERAP1 que se define en (a') es un péptido que tiene una actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, y comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos están sustituidos con otros residuos de aminoácidos, además de la glutamina en la posición 1/Q, el ácido aspártico en la posición 5/D y la glutamina en la posición 9/Q en la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 31. (a') abarca un péptido que inhibe la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. Este péptido es, por ejemplo, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que todos los residuos de tres aminoácidos que se describen a continuación se conservan, y residuos de aminoácidos en las otras posiciones están sustituidos en una secuencia de aminoácidos sucesiva que comprende 165-173 (SEQ ID NO: 31) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

La glutamina en la posición 165/Q,

el ácido aspártico en la posición 169/D y

la glutamina en la posición 173/Q de la SEQ ID NO: 35

En las realizaciones preferidas, la sustitución de residuos de aminoácidos aceptables en otras posiciones que los tres aminoácidos antes mencionados, es comúnmente 10 o menos, o 8 o menos, por ejemplo, 7 o menos,

preferiblemente 6 o menos, más preferiblemente 5 o menos, en particular preferiblemente 3 o menos. Los ejemplos de tal péptido ERAP1 incluyen un péptido que está constituido por los aminoácidos de 30 residuos o menos, o 20 residuos o menos, típicamente 19 residuos o menos, preferiblemente 18 residuos o menos, y más preferiblemente 17 residuos o menos.

- 5 En general, se reconoce que la sustitución para otros residuos de aminoácidos por la que las propiedades de la cadena lateral de aminoácidos de los residuos del aminoácido original se conservan, tiende a no tener ninguna influencia sobre las funciones del péptido inicial. Dicha sustitución se refiere a menudo como "sustitución conservadora" o "alteración conservadora". Por lo tanto, la sustitución en los anteriormente mencionados de (a') a (c') se realiza preferiblemente por la sustitución conservadora.
- 10 Las tablas de sustitución conservadoras que muestran aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos de la propiedad de una cadena lateral de aminoácido que se conserva deseablemente incluyen aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T), cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I y P), cadenas laterales que contienen un grupo hidroxilo (S, T e Y), cadenas laterales que contienen átomos de azufre (C y M); cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y amida (D, N, E y Q), cadenas laterales que contienen bases (R, K y H), y grupos funcionales de cadenas laterales que contienen aromáticos (H, F, Y y W) o cadenas laterales que tienen características del grupo funcional en común. Además, los 8 grupos descritos a continuación comprenden los aminoácidos que son reconocidos por ser mutuamente conservadoramente sustituidos, respectivamente, en la técnica:
 - 1) alanina (A) y glicina (G);
 - 20 2) ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E);
 - 3) asparagina (N) y glutamina (Q);
 - 4) arginina (R) y lisina (K);
 - 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M) y valina (V);
 - 6) fenil alanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W);
 - 25 7) serina (S) y treonina (T); y
 - 8) cisteína (C) y metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins, 1984).

Sin embargo, la sustitución en los anteriormente mencionados de (a') a (c') no está limitada a ello, y puede ser sustitución no conservativa siempre que la actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2 se mantenga.

- 30 El péptido de la presente invención puede comprender residuos de aminoácidos además del sitio de unión al polipéptido PHB2 en el polipéptido ERAP1 siempre que se mantenga la actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. Por ejemplo, el fragmento del polipéptido ERAP1 que comprende el sitio de unión al polipéptido PHB2 en el polipéptido ERAP1 es adecuado como el péptido de la presente invención. Por lo tanto, el fragmento del polipéptido ERAP1 (SEQ ID NO: 35) que comprende la secuencia de aminoácidos del ácido glutámico en la posición 165 al ácido glutámico en la posición 173 y la secuencia de los alrededores es un ejemplo preferible del péptido de la presente invención.
- 35

Por ejemplo, los ejemplos del péptido ERAP1 de la presente invención pueden incluir péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 (9 residuos), y está constituida por aminoácidos de, por ejemplo, 30 residuos o menos, o 20 residuos o menos, típicamente 19 residuos o menos, preferiblemente 18 residuos o menos, más preferiblemente 17 residuos o menos. Ejemplos de tales péptidos pueden incluir péptidos que comprenden la

- 40 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 (9 residuos) y la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de longitud completa que constituyen el polipéptido ERAP1, y están constituidas por aminoácidos de 30 residuos o menos, o 20 residuos o menos, típicamente de 19 residuos o menos, preferiblemente 18 residuos o menos, más preferiblemente 17 residuos o menos.
- 45 En las realizaciones preferidas de la presente invención, los aminoácidos que se añaden a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 pueden ser 0 (es decir, la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 31), o 1, o 2 o secuencias de aminoácidos más sucesivas que se seleccionan a partir de secuencias de aminoácidos de longitud completa que constituyen el polipéptido ERAP1 (SEQ ID NO: 35). La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 es una secuencia de aminoácidos que comprende la glutamina en la posición 165/Q, el ácido aspártico en la posición 169/D y la glutamina en la posición 173/Q de la secuencia de aminoácidos de longitud completa que constituye el polipéptido ERAP1 (SEQ ID NO: 35). Por lo tanto, en las realizaciones preferidas de la presente invención, los residuos de aminoácidos o secuencias de aminoácidos que se agregan a la SEQ ID NO: 31 pueden seleccionarse de secuencias de aminoácidos adyacentes a 165-173 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35. En otras palabras, el péptido ERAP1 de la presente invención es preferiblemente un péptido que comprende la
- 50

secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 31/QMLSDLTLQ, y que consiste en una secuencia de aminoácidos sucesivos seleccionada de las secuencias de aminoácidos que consisten en ATLS + QMLSDLTLQ + LRQR (correspondiente a una región cubierta por la SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 30).

5 El péptido de la presente invención tiene de manera deseable, ya sea una o ambas de las propiedades (i) y (ii) que se describen a continuación, además de la actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2:

(i) la propiedad de promover la translocación nuclear del polipéptido PHB2 en las células positivas para el receptor de estrógenos en el que se expresa el polipéptido ERAP1; y

10 (ii) la propiedad de promover la unión de los receptores de estrógenos presentes en el núcleo y/o en la membrana celular con el polipéptido PHB2 en las células positivas para el receptor de estrógenos en el que se expresa el polipéptido ERAP1.

15 Al tener ya sea una o ambas de las propiedades (i) y (ii) mencionadas anteriormente, el péptido de la presente invención suprime la activación de los receptores de estrógeno en la célula ERAP1-expresada. Como consecuencia, el péptido de la presente invención conduce a la supresión de la proliferación celular de las células positivas para el receptor de estrógenos. Las propiedades anteriormente mencionadas (i) y (ii) del péptido ERAP1 se pueden evaluar de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos descritos más adelante.

20 El polipéptido PHB2 es conocido por ser un co-regulador selectivo para los receptores de estrógenos, y suprime la activación transcripcional de los receptores de estrógenos por la interacción con el receptor de estrógeno (Kasashima K, J Biol Chem 2006; 281: 36401-10). Por otra parte, el polipéptido ERAP1 perturba la translocación nuclear del polipéptido PHB2, e inhibe la interacción entre el polipéptido PHB2 y el receptor de estrógenos en el núcleo mediante la unión al polipéptido PHB2 (Figs. 3A, 3B, 4A y 4B). Además, el polipéptido ERAP1 perturba la unión del receptor de estrógenos presente en la membrana celular con el polipéptido PHB2 (Figs. 3A, 3B y 4B). Como consecuencias de estas acciones, en células en las que se expresa en exceso el polipéptido ERAP1, la supresión para la activación de los receptores de estrógenos por el polipéptido PHB2 no funciona suficientemente, y la aceleración de la proliferación celular es inducida.

25 El péptido de la presente invención se caracteriza por un punto, que el péptido de la presente invención inhibe la unión de forma competitiva del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, y por lo tanto recupera la función de la supresión de la activación del receptor de estrógenos del polipéptido PHB2 inhibida por la unión al polipéptido ERAP1. Por lo tanto, el péptido de la presente invención deseablemente no perturba la translocación nuclear del polipéptido PHB2, y no perturba la unión del receptor de estrógenos para el polipéptido PHB2. Como se describió anteriormente, el fragmento del polipéptido ERAP1 que comprende el sitio de unión al polipéptido PHB2 es adecuado como el péptido de la presente invención. Sin embargo, un péptido cerca de la longitud completa del polipéptido ERAP1 es probable que perturbe la translocación nuclear del polipéptido PHB2, o que perturbe la unión del polipéptido PHB2 al receptor de estrógenos aunque el grado no sea tanto como el del polipéptido ERAP1. Por consiguiente, la secuencia parcial de aminoácidos del polipéptido ERAP1 contenida en el péptido de la presente invención preferiblemente tiene 100 residuos o menos, más preferiblemente 80 residuos o menos, y más preferiblemente 70 residuos o menos. En las realizaciones más preferidas, la secuencia de aminoácidos parcial del polipéptido ERAP1 contenida en el péptido de la presente invención tiene 50 residuos o menos, 40 residuos o menos, 30 residuos o menos, 25 residuos o menos, o 20 residuos o menos.

40 Además, el péptido de la presente invención puede comprender otras secuencias de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos derivada del polipéptido ERAP1 siempre que se mantenga la actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. También en este caso, el péptido de la presente invención, deseablemente no perturba la translocación nuclear del polipéptido PHB2, y la unión del polipéptido PHB2 al receptor de estrógenos. Por lo tanto, el péptido de la presente invención es preferiblemente un péptido de 100 residuos o menos, 80 residuos o menos, o 70 residuos o menos. En las realizaciones más preferidas, el péptido de la presente invención es un péptido de 50 residuos o menos, 40 residuos o menos, o 30 restos o menos. Los ejemplos preferidos de la secuencia de aminoácidos contenida en el péptido de la presente invención incluyen secuencias de aminoácidos que constituyen el péptido transcelular que se describe más adelante, y secuencias de engarce para la unión a otras sustancias, pero no se limita a las mismas.

50 Además, el péptido de la presente invención se puede modificar por otras sustancias. En este documento, el término "modificado", que se usa con respecto a un péptido, se refiere a que otra sustancia se une al péptido directamente o indirectamente. Ejemplos de la otra sustancia que modifica el péptido de la presente invención incluyen péptidos, lípidos, sacáridos, y polímeros naturales o sintéticos, pero no se limitan a los mismos. El péptido de la presente invención puede tener cualquier modificación, siempre que se mantenga la actividad de la inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. Además, el péptido de la presente invención puede impartir una función adicional por la modificación. Los ejemplos de la función adicional incluyen la propiedad de direccionamiento de la diana, la estabilidad y la permeabilidad de la membrana celular, pero no se limitan a las mismas.

Los ejemplos preferidos de la modificación en la presente invención incluyen la introducción de una sustancia permeable a la membrana celular. La estructura intracelular está blindada comúnmente del medio externo por una membrana celular. Por lo tanto, es difícil introducir eficazmente una sustancia extracelular dentro de una célula. Sin embargo, una cierta sustancia puede tener permeabilidad de la membrana celular, y se puede introducir en una célula sin ser bloqueada por la membrana celular. A una sustancia que no tiene permeabilidad con la membrana celular se le puede impartir la permeabilidad de la membrana celular al ser modificada con una sustancia que tiene permeabilidad de la membrana celular (sustancia permeable a la membrana celular). Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede modificarse con una sustancia permeable a la membrana celular por medio de la cual se introduce eficazmente en la célula. Además, en este documento, "permeabilidad de la membrana celular" se refiere a la propiedad de penetrar la membrana celular de un mamífero para entrar en el citoplasma. Además, "sustancia permeable a la membrana celular" se refiere a una sustancia que tiene "permeabilidad con la membrana celular".

Ejemplos de sustancia permeable a la membrana celular incluyen liposomas de fusión de membrana, y péptidos permeables a la membrana celular, pero no se limitan a los mismos. Por ejemplo, el liposoma de fusión de membrana se fusiona con una membrana celular, por medio del cual libera el contenido dentro de la célula. El liposoma de fusión de membrana se puede preparar, por ejemplo, mediante la modificación de la superficie del liposoma con una sustancia que tiene la propiedad de fusión de membrana. Ejemplos de liposomas de fusión de membranas incluyen los liposomas sensibles al pH (Yuba E, et al., J. Control. Release, 149, 72-80 (2011)), liposoma de fusión de membrana del virus Sendai (documento WO97/016171), liposoma modificado con un péptido permeable a la membrana celular, y similares. El péptido de la presente invención puede estar encerrado en el liposoma de fusión de membrana para ser introducido efectivamente en la célula. El recinto del péptido en el liposoma de fusión de membrana también se engloba en la "modificación" del péptido en la presente invención.

Con respecto al péptido permeable de la membrana celular, diversos péptidos de origen natural o sintetizados artificialmente han sido publicados hasta el momento (Joliot A. & Prochiantz A., Nat Cell Biol. 2004; 6: 189-96). Ejemplos del péptido permeable a la membrana celular incluyen los péptidos descritos a continuación, pero no se limitan a los mismos.

Poliarginina (Matsushita et al., (2003) J. Neurosci.; 21, 6000-7.);

Tat/RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 42). (Frankel et al, (1988) Cell 55, 1189-1193, Green & Loewenstein (1988) Cell 55, 1179-118);

Penetratin/RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 57) (Derossi et al, (1994) J. Biol. Chem. 269, 10444-50);

Buforin II/TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK (SEQ ID NO: 43) (Park et al, (2000) Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50);

Transportan/GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 44) (Pooga et al, (1998) FASEB J. 12, 67-77);

MAP (péptido modelo anfipático)/KLALKLALKALKAAALKLA (SEQ ID NO: 45). (Oehlke et al, (1998) Biochim. Biophys. Acta. 1414,127-39);

K-FGF/AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 46) (Lin et al, (1995) J. Biol. Chem. 270, 14255-8);

Ku70/VPMLK (SEQ ID NO: 47) (Sawada et al, (2003) Nature Cell Biol. 5,352-7);

Ku70/PMLKE (SEQ ID NO: 48) (Sawada et al, (2003) Nature Cell Biol. 5,352-7);

Prion/MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP (SEQ ID NO: 49) (Lundberg et al, (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90);

PVEC/LLILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO: 50) (Elmqvist et al, (2001) Exp. Cell Res. 269,237-44);

Pep-1/KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 51) (Morris et al., (2001) Nature Biotechnol. 19, 1173-6);

SynB1/RGGRLSYSRRRFFSTSTGR (SEQ ID NO: 52) (Rousselle et al., (2000) Mol. Pharmacol. 57, 679-86);

Pep-7/SDLWEMMMVSLACQY (SEQ ID NO: 53). (Gao et al., (2002) Bioorg. Med. Chem. 10,4057-65); y

HN-1/TSPLNIHNGQKL (SEQ ID NO: 54); (Hong y Clayman (2000) Cancer Res. 60, 6551-6).

La poliarginina mencionada anteriormente puede estar constituida a partir de cualquier número de residuos de arginina. Por ejemplo, la poliarginina se puede constituir a partir de 5 a 20 residuos de arginina. El número de los residuos de arginina que constituyen la poliarginina no está particularmente limitado siempre que la actividad de los presentes péptidos de inhibir la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2 no se altere, pero, en general, una poliarginina que consta de 11 residuos de arginina (SEQ ID NO: 55) se utiliza a menudo.

El péptido de la presente invención modificado con la sustancia permeable a la membrana celular puede ser representado por la fórmula general que se describe a continuación:

[R] – [D]

En la fórmula, [R] representa una sustancia permeable a la membrana celular, y [D] representa "un péptido que inhibe la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, que comprende el sitio de unión al polipéptido PHB2 en el polipéptido ERAP1". En la fórmula general mencionada anteriormente, [R] y [D] pueden estar directamente relacionadas, o indirectamente vinculadas a través de un enlazador y similares. Cuando [R] y [D] están vinculadas indirectamente, un péptido, un compuesto que tiene múltiples grupos funcionales, o similar, puede usarse como enlazador. Por ejemplo, cuando [R] es un péptido permeable a la membrana de la célula, los ejemplos preferidos del enlazador incluyen enlazadores que consisten en residuos de glicina. El número de los residuos de glicina que constituyen el enlazador no está particularmente limitado, pero preferiblemente de 1 a 10 residuos, más preferiblemente de 2 a 7 residuos, y aún más preferiblemente de 3 a 5 residuos. Además, la sustancia permeable a la membrana celular puede ser indirectamente ligada al "péptido que comprende el sitio de unión al polipéptido PHB2 en el polipéptido ERAP1 e inhibe la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2" al ser unido a la superficie de micropartículas. [R] puede estar vinculado a cualquier posición de [D]. Los ejemplos de la posición ligada a [R] incluyen el extremo N-terminal o C-terminal de [D], y las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que constituyen [D]. Preferiblemente, [R] está directamente ligado al extremo N-terminal o C-terminal de [D], o indirectamente unido a través de un enlazador. Por otra parte, varias moléculas [R] pueden estar ligadas a una molécula [D]. En este caso, la molécula [R] se puede introducir en varias posiciones diferentes de la molécula [D]. Como alternativa, [D] se puede modificar con múltiples [R] vinculadas entre sí.

Además, se sabe en la técnica que varios miméticos de aminoácidos particularmente útiles o aminoácidos no naturales se introducen con el fin de mejorar la estabilidad in vivo del péptido. Por lo tanto, este tipo de miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales pueden ser introducidos con el fin de mejorar la estabilidad in vivo del péptido de la presente invención. La estabilidad del péptido se puede confirmar mediante varios medios de cultivo biológicos tales como peptidasa, así como plasma sanguíneo humano y suero (por ejemplo, véase Coos Verhoef et al. (1986) Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 11: 291-302).

El péptido de la presente invención se caracteriza por un punto de tener una actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2. Tanto si el péptido construido tiene una actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2 como si no puede confirmarse mediante la comparación de los niveles de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2 en presencia y en ausencia del péptido. Es decir, cuando el nivel de unión en presencia del péptido es menor que el nivel de unión en ausencia del péptido, el péptido puede ser determinado que tiene "actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2".

La medición para el nivel de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2 se puede realizar usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, los métodos incluyen la inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-ERAP1 o un anticuerpo anti-PHB2, cromatografía de afinidad, y un biosensor utilizando fenómenos de resonancia de plasmón de superficie.

Como un método específico, por ejemplo, el polipéptido ERAP1 y el polipéptido PHB2 se incuban en presencia y en ausencia del péptido de prueba. A continuación, la solución de reacción se inmunoprecipita con anticuerpo anti-ERAP1 o anticuerpo anti-PHB2. Además, se lleva a cabo análisis de transferencia de Western del inmunoprecipitado. El nivel de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2 se puede confirmar mediante la detección de al menos uno de los niveles de polipéptido PHB2 inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-ERAP1 o el nivel del polipéptido ERAP1 inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-PHB2. El polipéptido ERAP1 y el polipéptido PHB2 usados en este documento se pueden preparar por alguna técnica de ingeniería genética conocida. Además, el lisado celular de células productoras de estos polipéptidos puede ser también utilizado. Como células productoras de estos polipéptidos, pueden ser usadas las líneas celulares que se describen en los Ejemplos de la memoria descriptiva.

Alternativamente, pueden ser usados los métodos que se describen en los Ejemplos de la memoria descriptiva. Específicamente, en presencia y en ausencia del péptido de prueba, se cultivan las células positivas para el receptor de estrógenos. Entonces, las células se lisan con un tampón de lisis apropiado. Después, se pueden realizar la inmunoprecipitación y el análisis de transferencia Western usando el lisado de células de manera similar a como se describe anteriormente.

Un péptido que se ha confirmado que tiene "actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2" por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente se determina como un péptido que tiene "actividad de inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2".

Además, el péptido de la presente invención puede tener ya sea una o ambas de las propiedades (i) y (ii) que se describen a continuación como una propiedad deseable:

(i) la propiedad de promover la translocación nuclear del polipéptido PHB2 en las células positivas para el receptor de estrógenos en las que se expresa el polipéptido ERAP1; y

(ii) la propiedad de promover la unión de los receptores de estrógenos presentes en el núcleo y/o en la membrana celular con el polipéptido PHB2 en las células positivas para el receptor de estrógenos en las que se expresa el polipéptido ERAP1.

- 5 Tenga o no el péptido de la presente invención la propiedad mencionada anteriormente puede ser confirmado mediante la comparación de (i) el nivel de translocación nuclear del polipéptido PHB2, y/o (ii) el nivel de la unión del receptor de estrógeno al polipéptido PHB2 en presencia y en ausencia del péptido de la presente invención. Es decir, cuando el nivel en la presencia del péptido de la presente invención es más alto que el nivel en ausencia del péptido de la presente invención, el péptido de la presente invención puede ser determinado que tiene las propiedades (i) y/o (ii) mencionadas anteriormente.
- 10 Como método específico, por ejemplo, puede ser utilizado el método que se describe en los ejemplos de la memoria descriptiva. Específicamente, cuando se investiga la propiedad del punto (i) anteriormente mencionado, las células positivas para el receptor de estrógeno son estimuladas con estradiol durante 24 horas con adición o sin adición del péptido de la presente invención. Entonces, las células se fraccionan mediante centrifugación por gravedad específica. Después, el polipéptido PHB2 presente en la fracción nuclear se detecta mediante análisis de
- 15 transferencia de Western y similar. Cuando el nivel de polipéptido del polipéptido PHB2 detectado en la fracción nuclear aumenta en un caso en el que se añade el péptido de la presente invención en comparación con un caso en el que no se añade el péptido de la presente invención, se determina que el péptido de la presente invención tiene la propiedad (i) anteriormente mencionada. Además, el nivel del polipéptido PHB2 presente en el núcleo puede ser también detectado por la tinción inmunoquímica como se describe en los Ejemplos de la memoria descriptiva.
- 20 Cuando se investigaba la propiedad (ii) anteriormente mencionada, las células positivas para el receptor de estrógeno se estimularon con estradiol durante 24 horas, con adición o sin adición del péptido de la presente invención. Entonces, las células se fraccionaron mediante centrifugación por gravedad específica. Entonces, las fracciones del citoplasma y nucleares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-receptor de estrógeno o el anticuerpo anti-PHB2. Además, se lleva a cabo el análisis de transferencia Western del inmunoprecipitado. Como
- 25 consecuencia, cuando el nivel de unión del receptor de estrógenos para el polipéptido PHB2 aumenta en la fracción del citoplasma y/o la fracción nuclear en un caso en el que se añade el péptido de la presente invención en comparación con un caso en que el péptido de la presente invención no se añade, se determina que el péptido de la presente invención tiene la propiedad (ii) mencionada anteriormente.
- El péptido de la presente invención se puede fabricar usando algún método bien conocido por cualquier experto normal en la técnica. Por ejemplo, el péptido de la presente invención se puede obtener por síntesis química basada en la secuencia de aminoácidos. El método para sintetizar químicamente el péptido se conoce y el péptido de la presente invención puede ser sintetizado químicamente basado en una secuencia de aminoácidos seleccionada como el péptido de la presente invención por cualquier experto normal en la técnica. El método para sintetizar químicamente el péptido se describe en, por ejemplo, los documentos que se describen a continuación;
- 30 (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, vol. 2, Academic Press, Nueva York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1975;
- (iv) Fundamentals and Experiment of Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1985;
- (v) Development of Pharmaceuticals (segundo volumen) (en japonés), vol. 14 (Peptide Synthesis), Hirokawa, 1991;
- 40 (vi) El documento WO99/67288; y
- (vii) Barany G. & Merrifield R. B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

- Además, el péptido de la presente invención se puede obtener por técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención se inserta en un vector de expresión apropiado, y el vector se introduce en una célula huésped apropiada para preparar una célula transformada. Entonces, las células huésped se cultivan para producir el péptido de la presente invención, y el extracto celular se prepara. En la purificación del presente péptido a partir del extracto celular, puede ser utilizada alguna técnica estándar para la purificación de proteínas. Por ejemplo, el presente péptido puede ser purificado
- 50 mediante la selección y la combinación de cromatografía en columna, filtración por filtros, ultrafiltración apropiadamente, desplazamiento salino, precipitación con disolventes, extracción con disolventes, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de amida SDS-poliacrílico, electroforesis de punto isoelectrónico, diálisis y recristalización. Además, el péptido de la presente invención puede ser también sintetizado por un sistema de traducción in vitro en el que los elementos necesarios para la síntesis de proteínas se reconstituyen in vitro.

Cuando se utiliza una técnica de ingeniería genética, el péptido de la presente invención puede también expresarse como una proteína de fusión con otro péptido. Un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención y un polinucleótido que codifica el otro péptido se unen para convertirse en un esqueleto interno, se inserta en un vector de expresión apropiado, el vector se introduce en una célula huésped apropiada, y se preparan las células transformadas. Entonces, las células huésped se cultivan para producir una proteína de fusión del péptido de la presente invención con el otro péptido, y el extracto celular se prepara. La purificación de la proteína de fusión a partir del extracto de células se puede realizar, por ejemplo, mediante la captura de la proteína de fusión con una cromatografía de afinidad utilizando una columna a la que se une una sustancia que tiene afinidad para la proteína de fusión. Además, si el péptido de la presente invención y el otro péptido están unidos de antemano a través de una secuencia de engarce que se puede cortar por una enzima tal como peptidasa, proteasa y proteasoma, la proteína de fusión capturada en la columna se puede tratar con estas enzimas para separar el péptido de la presente invención a partir de la columna. Ejemplos del otro péptido que se puede utilizar en la formación de la proteína de fusión incluyen los péptidos que se describen a continuación, pero no se limita a los mismos:

FLAG (Hopp et al, (1988) Biotechnology 6, 1204-1210.);

6xHis o 10xHis que consta de residuos de histidina (His);

hemaglutinina de la gripe (HA);

fragmento de c-myc humano, fragmento de VSV-GP; fragmento de VIH p18;

marcador T7; marcador HSV;

marcador E; fragmento de antígeno SV40 T;

marcador Ick;

fragmento de α -tubulina; marcador B;

fragmento de la proteína C;

GST (glutati6n-S-transferasa);

HA (hemaglutinina de la gripe);

regi6n constante de inmunoglobulina;

β -galactosidasa; y;

MBP (proteína de uni6n a maltosa).

2. Polinucle6tido que codifica el péptido de la presente invenci6n, vector, y c6lula huésped

La presente invenci6n tambi6n proporciona un polinucle6tido que codifica el péptido de la presente invenci6n. Adem6s, la presente invenci6n tambi6n proporciona un vector que comprende el polinucle6tido, y una c6lula huésped que comprende el vector. El polinucle6tido, el vector, y la c6lula huésped se pueden utilizar para la fabricaci6n del péptido de la presente invenci6n.

El polinucle6tido de la presente invenci6n puede fabricarse por cualquier m6todo conocido para cualquier experto normal en la t6cnica. Por ejemplo, el polinucle6tido de la presente invenci6n se pueden sintetizar usando t6cnicas en fase s6lida tales como las descritas en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; y Matthes et al, EMBO J 1984, 3: 801-5. Adem6s, el polinucle6tido de la presente invenci6n se puede preparar tambi6n utilizando alguna t6cnica de ingenieria gen6tica. Por ejemplo, se construye un cebador a partir de una secuencia de bases parcial del gen ERAP1 que codifica la secuencia de amino6cidos seleccionada como el péptido de la presente invenci6n (SEQ ID NO: 34), y se realiza la PCR de transcripci6n inversa usando el ARNm extraido de las c6lulas que expresan el polipéptido ERAP1 como plantilla. Esto permite la amplificaci6n del polinucle6tido de la presente invenci6n.

El polinucle6tido de la presente invenci6n se inserta en un vector de expresi6n apropiado, y el vector puede ser introducido en una c6lula huésped apropiada, para producir el péptido de la presente invenci6n en la c6lula huésped.

Por ejemplo, cuando se selecciona Escherichia coli como la c6lula huésped, y se amplifica el vector en una gran cantidad en la Escherichia coli (por ejemplo, JM109, DH5a, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener "ori" para la amplificaci6n en Escherichia coli, y un gen marcador para la selecci6n de la Escherichia coli transformada (por ejemplo, un gen resistente a un fármaco seleccionado por un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina y cloranfenicol). Por ejemplo, puede ser utilizado un vector de la serie M13, un vector de la serie pUC, pBR322, pBluescript, o pCR-Script. Cuando se utiliza un vector para la producci6n del péptido de la presente invenci6n, un vector de expresi6n es especialmente útil. Por ejemplo, un vector de expresi6n para la expresi6n en Escherichia coli

debe tener las características mencionadas anteriormente para la amplificación en *Escherichia coli*. Cuando se utiliza como célula huésped una *Escherichia coli* tal como JM109, DH5a, HB101 o XL1Blue, el vector debe tener un promotor que pueda expresar eficazmente el gen deseado en *Escherichia coli*, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward, et al., *Nature* 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), el promotor araB (Better, et al, *Science* 240 1041-3 (1988), o el promotor T7. Además, el vector también puede comprender una secuencia señal para la secreción del polipéptido. Un ejemplo de la secuencia señal que controla la secreción del polipéptido al periplasma de *Escherichia coli* es la secuencia señal pelB (Lei, et al, *J Bacteriol* 169: 4379-83 (1987)). Ejemplos de medios para introducir el vector en una célula huésped diana incluyen un método de cloruro de calcio y un método de electroporación.

Además de *Escherichia coli*, por ejemplo, los vectores útiles incluyen vectores de expresión derivados de células de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen) y pEGF-BOS (Mizushima S., *Nucleic Acids Res* 18 (17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, "sistema de expresión de vaculovirus Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión de origen vegetal (por ejemplo, pMH1, PMH2) vectores de expresión derivados de virus de animales (por ejemplo, pVHS, PMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZlpneo), vectores de expresión derivados de levadura (por ejemplo, "kit de expresión de Pichia" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01), y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608, pKTH50).

Con el fin de expresar un vector en células animales tales como células CHO, células COS o células NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para la expresión en este tipo de células, por ejemplo, el promotor de SV40 (Mulligan, et al., *Nature* 277: 108-14 (1979)), el promotor MMLV-LTR, el promotor EF1 α (Mizushima, et al, *Nucleic Acids Res.* 18: 5322 (1990)), o el promotor CMV. Además, el vector tiene preferiblemente un gen marcador para la selección de un transformante (por ejemplo, un gen resistente a fármaco seleccionado por un fármaco (por ejemplo, neomicina, G418)). Los ejemplos de vectores conocidos que tienen estas características incluyen pMAM, pDR2, PBK-RSV, PBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Además, el polinucleótido de la presente invención se puede insertar en un vector apropiado, y se introduce en una célula diana para la producción del péptido de la presente invención en una célula diana. El péptido de la presente invención producido en la célula diana inhibe la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, e induce la supresión para la proliferación celular de la célula diana. En este caso, un vector en el que se inserta el polinucleótido de la presente invención, puede ser un vector para insertar de forma estable el polinucleótido de la presente invención en el genoma de la célula diana (por ejemplo, véase Thomas KR y Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 con respecto a la descripción de un vector casete recombinante homólogo). Por ejemplo, véase Wolff et al, *Science* 1990, 247: 1465-8; Patente de Estados Unidos N° 5.580.895; Patente de Estados Unidos No. 5.589.466; Patente de Estados Unidos N° 5.804.566; Patente de Estados Unidos N° 5.739.118; Patente de Estados Unidos N° 5.736.524; Patente de Estados Unidos No. 5.679.647; y documento WO98/04720.

Además, el polinucleótido de la presente invención puede ser también insertado en un vector de expresión tal como un vector viral o un vector bacteriano. Los ejemplos del vector de expresión incluyen huéspedes de virus atenuados tales como el de la viruela de las vacas o la varicela aviar (por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 4.722.858). Otros ejemplos del vector que se pueden usar incluyen, bacilo de Calmette Guérin (BCG) (Stover et al, *Nature* 1991, 351: 456-60). Otros ejemplos son los vectores de adenovirus y vectores de virus adeno - asociados, vectores de retrovirus, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de la toxina del ántrax destoxicados, etc. (Shata et al, *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock et al, *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; e Hipp et al, *In Vivo* 2000, 14: 571-85.).

3. Composición farmacéutica que comprende el péptido o el polinucleótido de la presente invención y el uso de los mismos

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención.

El péptido de la presente invención inhibe la unión de polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, y por lo tanto induce la supresión de la activación de los receptores de estrógenos por el polipéptido PHB2. Como consecuencia, el péptido de la presente invención conduce a la supresión de la proliferación celular en las células positivas para el receptor de estrógeno. Así, la composición farmacéutica de la presente invención es útil para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades proliferativas celulares, debido a la activación de los receptores de estrógenos. Ejemplos de tales enfermedades proliferativas células incluyen los cánceres.

Se sabe que el cáncer de mama en particular entre los cánceres está profundamente relacionado con la activación de los receptores de estrógenos. El polipéptido ERAP1 es un nuevo factor de regulación para la activación de los receptores de estrógenos, y se expresa en alta frecuencia en muchas muestras de cáncer de mama y células de cáncer de mama. Por otra parte, se ha confirmado que casi no se reconoce la expresión en tejidos normales (Kim JW, Akiyama M, Park JH, et al. *Cancer Sci.* 2009; 100: 1468-1478). Por lo tanto, se considera que la función de la supresión del polipéptido PHB2 en la activación de los receptores de estrógenos es inhibida por la expresión del polipéptido ERAP1 en el cáncer de mama, y como consecuencia, se promueve la proliferación de células de cáncer de mama. De acuerdo con ello, la composición farmacéutica de la presente invención es particularmente adecuada

para tratar y/o prevenir el cáncer de mama. Además, la composición farmacéutica de la presente invención es particularmente útil para el cáncer de mama que es positivo para el receptor de estrógeno, y en el que el polipéptido ERAP1 se expresa entre los cánceres de mama. Sin embargo, la composición farmacéutica de la presente invención no se limita al cáncer de mama, sino que la composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse para un cáncer que sea positivo para el receptor de estrógeno, y en el que se exprese el polipéptido ERAP1. Los ejemplos de cánceres positivos para los receptores de estrógeno, además del cáncer de mama, incluyen el cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata (Nelles JL, et al., Expert Rev Endocrinol Metab. 2011 Mayo; 6 (3): 437-451), cáncer de pulmón (en particular el cáncer de pulmón de células no pequeñas) (Stabile LP, et al, Cancer Res.. 2005 15 de Feb; 65 (4): 1459-1470; Marquez-Garban DC, et al., Steroides. 2007 Feb; 72 (2): 135-43), etc., pero no se limitan a los mismos.

Además, el péptido de la presente invención tiene efecto de supresión no sólo sobre la proliferación celular dependiente de estrógenos en las células positivas para el receptor de estrógeno, sino también en la proliferación de células independientes de estrógenos (Ejemplo 3). Entre los cánceres de mama positivos para el receptor de estrógeno, del 60 al 70% es cáncer de mama dependiente de estrógenos, y el resto es cáncer de mama independiente de estrógenos. El cáncer de mama independiente de estrógenos es refractario o resistente con respecto a los agentes de terapia hormonal convencionales, tales como el tamoxifeno y los inhibidores de aromatasa, y no puede ser tratado con el agente de la terapia hormonal convencional. Se considera que en tales cáncer de mama independientes de estrógenos, el receptor de estrógeno está activado por otros factores diferentes a los estrógenos (por ejemplo, el factor de crecimiento (EGF, IGF, etc.), la mutación de los receptores de estrógenos, la fosforilación del receptor de estrógenos, etc.), y se promueve la proliferación celular. El péptido de la presente invención también tiene un efecto de supresión sobre la proliferación celular independiente de estrógenos del cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno, y por lo tanto la composición farmacéutica de la presente invención también se puede aplicar al tratamiento y/o prevención del cáncer de mama independiente de estrógenos o positivo para el receptor de estrógeno.

Además, se confirmó que el péptido de la presente invención tiene efecto de supresión de proliferación celular también con respecto a las células de cáncer de mama negativas para el receptor de estrógeno (Fig. 40). Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención también se puede aplicar al tratamiento y/o la prevención de cáncer de mama negativo para el receptor de estrógeno.

Además, el péptido de la presente invención suprime de manera efectiva la proliferación celular de células de cáncer de mama resistentes al tamoxifeno (Ejemplo 2 y el Ejemplo 8). El tamoxifeno es un antiestrógeno y es considerado que suprime la proliferación celular dependiente de estrógenos por la unión al receptor de estrógeno en competencia con los estrógenos. El tamoxifeno es ampliamente utilizado en la terapia adyuvante postoperatoria o tratamiento estándar del cáncer de mama avanzado/recaída, pero alrededor del 30% del cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno es refractario al tamoxifeno. Además, mediante el uso a largo plazo, el cáncer de mama puede volverse resistente al tamoxifeno. El péptido de la presente invención tiene un efecto de supresión de la proliferación celular de células de cáncer de mama resistentes al tamoxifeno y, por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede aplicar adecuadamente a dicho cáncer de mama resistente al tamoxifeno.

Además, cuando se utilizó el péptido de la presente invención en combinación con tamoxifeno, el efecto de supresión de la proliferación celular en las células positivas para el receptor de estrógeno, y el efecto antitumoral in vivo se promovieron notablemente (Ejemplo 4). Como se describió anteriormente, el tamoxifeno es un antiestrógeno, y tiene un mecanismo diferente para ejercer el efecto de supresión de la proliferación celular en comparación con el péptido de la presente invención. Por lo tanto, se considera que el uso concomitante de tamoxifeno con el péptido de la presente invención potencia los efectos terapéuticos de tamoxifeno en el cáncer. Así, la composición farmacéutica de la presente invención se utiliza adecuadamente en el tratamiento y/o la prevención del cáncer como uso concomitante con tamoxifeno con el propósito de potenciar los efectos terapéuticos del tamoxifeno en el cáncer. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser utilizada también de forma concomitante con otros agentes de terapia hormonal distintos al tamoxifeno. En este documento, la expresión "agente de terapia hormonal" se refiere a un medicamento que suprime la proliferación celular dependiente de estrógenos mediante la supresión de las acciones de los estrógenos o la producción de estrógenos in vivo. Ejemplos del agente de terapia hormonal incluyen un inhibidor de aromatasa, una preparación del agonista de LH-RH, y una preparación de progesterona, pero no se limitan a los mismos. Estos agentes de terapia hormonal convencional tienen diferentes mecanismos para inducir el tratamiento del cáncer en comparación con el péptido de la presente invención, y de este modo del uso concomitante con la composición farmacéutica de la presente invención se puede esperar una potenciación de los efectos terapéuticos de los mismos sobre el cáncer.

Por lo tanto, la presente invención proporciona, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas descritas en (1) a (7) a continuación:

(1) Una composición farmacéutica que comprende al menos un ingrediente seleccionado de un grupo que consiste en un péptido de la presente invención, un polinucleótido que codifica el péptido, y una sal farmacéuticamente aceptable del péptido;

(2) La composición farmacéutica descrita en (1) para tratar y/o prevenir el cáncer;

(3) La composición farmacéutica descrita en (2), en donde el cáncer es un cáncer de mama;

(4) La composición farmacéutica descrita en (1) o (2), en el que el cáncer es positivo para el receptor de estrógenos;

(5) La composición farmacéutica descrita en (4), en el que el cáncer es resistente al tamoxifeno;

5 (6) Una composición farmacéutica que comprende un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido para potenciar los efectos terapéuticos de un agente de terapia hormonal en el cáncer; y

(7) Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido para la supresión de la activación de los receptores de estrógenos en células positivas para el receptor de estrógenos.

10 Ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable del péptido de la presente invención, que se pueden utilizar en la presente invención, incluyen sales con un ácido farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, ácido inorgánico o ácido orgánico) o una base (por ejemplo, metal alcalino, metal alcalino-térreo o amina). Los ejemplos de las realizaciones preferidas incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales sales incluyen sales con un ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, o ácido acético), o sales con un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, o ácido de meglumina). Los ejemplos preferidos de la sal farmacéuticamente aceptable del péptido de la presente invención incluyen la sal de ácido acético, sal de ácido clorhídrico, sal de ácido de meglumina, y la sal de amonio.

20 Además, la presente invención proporciona el uso del péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido en la fabricación de la composición farmacéutica descrita en una cualquiera de los puntos (1) a (7) anteriormente mencionados. Además, la presente invención proporciona además un método o proceso para la fabricación de la composición farmacéutica descrita en uno cualquiera de los puntos (1) a (7) anteriormente mencionados. El método o proceso incluye una etapa de la prescripción de un vehículo farmacéuticamente aceptable y el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido como ingrediente activo. Además, la presente invención proporciona un método o proceso para la fabricación de la composición farmacéutica descrita en uno cualquiera de los puntos (1) a (7) anteriormente mencionados. El método o proceso comprende una etapa de mezclar un ingrediente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde este ingrediente activo es el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido. Además, la presente invención proporciona el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido para uso en el tratamiento de cáncer, la potenciación de los efectos terapéuticos de un agente de terapia hormonal en el cáncer, o la supresión de la activación del receptor de estrógeno en células positivas para el receptor de estrógeno.

35 Además, la presente descripción proporciona un método para tratar y/o prevenir una enfermedad proliferativa celular debida a la activación de los receptores de estrógenos, que comprende una etapa de administrar el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido a un sujeto. Los ejemplos de la enfermedad proliferativa celular tratada y/o prevenida por el método de la presente descripción incluyen el cáncer. El cáncer adecuado para la aplicación del método de la presente descripción es similar a los descritos anteriormente para la composición farmacéutica de la presente invención. A saber, el método de la presente descripción se aplica preferentemente al cáncer que es positivo para el receptor de estrógeno, y en el que se expresa el polipéptido ERAP1. Además, la presente descripción proporciona un procedimiento para suprimir la activación de los receptores de estrógenos, que comprende una etapa de poner el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido en contacto con células positivas para el receptor de estrógeno.

45 La composición farmacéutica de la presente invención se administra preferiblemente a seres humanos, pero se puede administrar a otros mamíferos, por ejemplo, un ratón, una rata, un cobaya, un conejo, un gato, un perro, una oveja, un cerdo, una vaca, un mono, un babuino, y un chimpancé.

La composición farmacéutica de la presente invención contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido como ingrediente activo. La "cantidad farmacéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para lograr el propósito de la composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir el cáncer, un ejemplo de la cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser una cantidad de inducción de la supresión para la velocidad de proliferación del cáncer, supresión de la capacidad metastásica, extensión del tiempo de vida, supresión o retraso de la generación de cáncer, o alivio de diversos síntomas clínicos implicados en el cáncer cuando se administra a un paciente. La supresión de la velocidad de proliferación del cáncer puede ser la supresión, por ejemplo, en aproximadamente 5% o más en comparación con el caso en que no se administra la composición farmacéutica de la presente invención. La supresión de la velocidad de proliferación del cáncer puede ser preferiblemente de aproximadamente 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 75% o más, 80% o más, 90% o más, o 100% o más.

Además, cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para potenciar los efectos terapéuticos de un agente de terapia hormonal sobre el cáncer, un ejemplo de la cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser una cantidad de inducción de la potenciación de los efectos terapéuticos de un agente de terapia hormonal en el cáncer cuando se administra a un paciente en comparación con el caso en que no se administra la composición farmacéutica de la presente invención. Los efectos terapéuticos del agente de terapia hormonal en el cáncer que se pueden comparar pueden ser, por ejemplo, la supresión de la velocidad de proliferación del cáncer, la supresión de la capacidad metastásica, la extensión del tiempo de vida, la supresión o el retraso de la generación de cáncer, o el alivio de diversos síntomas clínicos implicados en el cáncer. Por ejemplo, la cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser una cantidad para potenciar el efecto de supresión de la velocidad de proliferación del cáncer mediante un agente de terapia hormonal en aproximadamente 5% o más en comparación con el caso en que no se administre la composición farmacéutica de la presente invención. La potenciación del efecto de supresión de la velocidad de proliferación del cáncer mediante un agente de terapia hormonal puede ser preferiblemente de aproximadamente 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 75% o más, 80% o más, 90% o más, o 100% o más.

Además, cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para la supresión de la activación de los receptores de estrógenos de las células positivas para el receptor de estrógeno, un ejemplo de la cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser una cantidad que induzca la supresión de la activación del receptor de estrógenos en las células positivas para el receptor de estrógeno cuando se administra a un paciente, en comparación con el caso en que no se administre la composición farmacéutica de la presente invención. La supresión de la activación de los receptores de estrógenos puede ser confirmada, por ejemplo, mediante la detección de la supresión para el nivel de expresión de un gen diana para la activación transcripcional por los receptores de estrógeno (gen que tiene un elemento responsable de estrógeno (ERE)), la supresión para el nivel de fosforilación del receptor de estrógeno, la supresión para el nivel de fosforilación de una molécula señal tal como IGF-1R β , Shc, Akt, PI3K y MAPK, y similares. Por ejemplo, la cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser una cantidad que suprima cualquiera de los niveles ejemplificados anteriormente en aproximadamente un 5% o más, en comparación con el caso en que no se administre la composición farmacéutica de la presente invención. La supresión de cualquiera de los niveles ejemplificados anteriormente puede ser preferentemente aproximadamente de 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 75% o más, 80% o más, 90 % o más, o 100% o más.

La cantidad farmacéuticamente eficaz puede depender de muchos factores, incluyendo la edad y el sexo del sujeto, el propósito de la administración, la gravedad de la enfermedad y la vía de administración. Sin embargo, la determinación de la cantidad farmacéuticamente eficaz en la composición farmacéutica de la presente invención puede realizarse de manera suficiente por cualquier experto normal en la técnica. Por ejemplo, la cantidad farmacéuticamente eficaz en la composición farmacéutica de la presente invención puede ser más o menos primero estimada a partir de un ensayo de cultivo celular y/o modelo animal. Por ejemplo, la cantidad farmacéuticamente eficaz se puede prescribir en un modelo animal a fin de alcanzar la concentración de circulación que cubre la IC₅₀ (dosis por la cual el 50% de las células muestra efectos deseados) determinada en el cultivo celular. La cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser también determinada, por ejemplo, por procedimientos farmacéuticos estándar para determinar la LD₅₀ (dosis por la cual el 50% de una población se lleva a la muerte) y ED₅₀ (dosis por la cual se trata con eficacia el 50% de una población) en un cultivo celular o animal de experimentación. La relación de la dosis para las acciones tóxicas a la dosis para los efectos terapéuticos es el índice terapéutico (es decir, la relación de LD₅₀ y ED₅₀). En la prescripción de un rango de dosis para uso en seres humanos, se pueden utilizar los datos obtenidos de tal ensayo de cultivo celular y ensayo en animales. La dosis de tales polipéptido y polinucleótido puede estar dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que casi no tenga absolutamente ninguna toxicidad, y que cubra la ED₅₀. La dosis en este intervalo puede cambiar dependiendo de la forma de dosificación unitaria que se utiliza y la vía de administración que se utiliza. La prescripción exacta, la vía de administración, y la dosis pueden ser seleccionadas por cualquier médico individual en su consideración del estado del paciente (por ejemplo, véase Fingl et al. (1975) en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch.1 p1). La dosis y el intervalo de administración pueden ser regulados individualmente a fin de obtener la concentración plasmática suficiente del ingrediente activo para el mantenimiento de los efectos deseados.

En cuanto a la dosis a modo de ejemplo, por ejemplo, el péptido de la presente invención o el polinucleótido que codifica el péptido se pueden administrar a una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg/día. La dosis es preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 200 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 150 mg/kg/día, y aún más preferiblemente de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 100 mg/kg/día. El intervalo de dosis para un adulto (60 kg de peso corporal) es comúnmente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 17,5 g/día, preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 g/día, y más preferiblemente de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 3 g/día. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener el péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido en la cantidad descrita anteriormente en un comprimido u otra forma de dosificación unitaria proporcionada como una unidad individual. Alternativamente, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener la dosis que se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en una unidad que contenga aproximadamente de 5 mg a aproximadamente 500 mg, preferiblemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg como múltiples preparaciones.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener opcionalmente otras sustancias terapéuticas como ingrediente activo. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener otros agentes de terapia hormonal (tamoxifeno, un inhibidor de aromatasas, una preparación de agonista de LH-RH, una preparación de progesterona, etc.). Como se muestra en los ejemplos, se confirmó que cuando el péptido de la presente invención se administra junto con tamoxifeno, el efecto antitumoral aumenta en comparación con el caso en que se administran de forma individual (Ejemplo 4). Por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende el péptido de la presente invención y otro agente de terapia hormonal se ejemplifica como la realización preferida de la composición farmacéutica de la presente invención. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener, por ejemplo, un agente anti-inflamatorio, un analgésico, un agente de terapia química, y similares. Estas diversas preparaciones que se mezclan con el péptido ERAP1 se pueden mezclar en una forma de un profármaco o en una sal farmacéuticamente aceptable.

Además del hecho de que la composición farmacéutica de la presente invención contiene otra sustancia terapéutica como tal, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar con uno o más tipos de otras composiciones farmacéuticas, al mismo tiempo o sucesivamente. Como se ha descrito anteriormente, cuando el péptido de la presente invención se usa en combinación con otro agente para la terapia de hormonas, se espera un aumento del efecto antitumoral en comparación con el caso en el que se administran de forma individual. La presente descripción incluye los métodos descritos a continuación como las realizaciones preferidas:

- un método para tratar y/o prevenir el cáncer, que comprende una etapa de administrar el péptido de la presente invención o el polinucleótido que codifica el péptido a un sujeto, y una etapa de administrar un agente de terapia hormonal a un sujeto; y

- un método para potenciar los efectos terapéuticos de un agente de terapia hormonal en el cáncer de mama en un sujeto, que comprende las etapas (a) y (b) descritas a continuación:

- (a) una etapa de administrar un agente de terapia hormonal a un sujeto; y

- (b) una etapa de administrar el péptido de la presente invención o el polinucleótido que codifica el péptido a un sujeto.

A saber, la presente descripción proporciona un método para potenciar los efectos terapéuticos de uno o ambos de un agente de terapia hormonal y un agente de terapia química, que comprende una etapa de administrar el péptido ERAP1 a un sujeto al que ya sea uno o ambos de un agente de terapia hormonal y un agente de terapia química se han administrado. Alternativamente, la presente invención se refiere al uso de cualquier ingrediente seleccionado de un grupo que consiste en (a) a (c) descrito a continuación en la fabricación de una composición farmacéutica para potenciar los efectos terapéuticos de uno o ambos de un agente de terapia hormonal y un agente de terapia química:

- (a) el péptido ERAP1 de la presente invención;

- (b) un polinucleótido que codifica el péptido; y

- (c) una sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para potenciar los efectos terapéuticos de uno o ambos de un agente de terapia hormonal y un agente de terapia química, que comprende cualquier ingrediente seleccionado de un grupo que consiste en los puntos (a) a (c) anteriormente mencionados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención proporciona un método para fabricar una composición farmacéutica para potenciar los efectos terapéuticos de uno o ambos de un agente de terapia hormonal y un agente de terapia química, que comprende una etapa de mezclar cualquier ingrediente seleccionado de un grupo que consiste en los puntos (a) a (c) anteriormente mencionados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una enfermedad para la cual se espera la potenciación de los efectos terapéuticos de la presente invención es el cáncer que es positivo para el receptor de estrógeno, y en el que se expresa el polipéptido ERAP1. Ejemplos de tales cánceres incluyen el cáncer de mama humano.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención puede estar contenida en un artículo y/o kit fabricado que comprende un material útil para tratar y/o prevenir el cáncer. Más específicamente, abarcado en el kit de la presente invención está un kit para tratar un cáncer que es positivo para el receptor de estrógeno, y en el que se expresa el polipéptido ERAP1, que comprende:

- (i) uno o ambos de un agente de terapia hormonal y un agente de terapia química, y

- (ii) cualquier ingrediente seleccionado de un grupo que consiste en los siguientes (a) - (c):

- (a) el péptido ERAP1 de la presente invención;

- (b) un polinucleótido que codifica el péptido; y

- (c) una sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

Un artículo manufacturado puede comprender un recipiente para cualquier composición farmacéutica de la presente invención junto con una etiqueta. Ejemplos de recipientes apropiados incluyen una botella, un vial, y un tubo de ensayo. El recipiente puede estar formado a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. La etiqueta del recipiente debe indicar que la composición farmacéutica se utiliza en el tratamiento y/o la prevención de una o más condiciones de una enfermedad. La etiqueta también puede indicar indicaciones de administración, etc.

El kit que comprende la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además opcionalmente un segundo recipiente que aloje un diluyente farmacéuticamente aceptable, además del recipiente anteriormente mencionado. El kit puede contener además otros materiales deseados desde el punto de vista comercial y el punto de vista del usuario, que incluyan otro tampón, un diluyente, un filtro, una aguja, una jeringa, y un documento adjunto que tenga instrucciones.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede poner en un paquete o dispositivo dispensador, según sea necesario, que puede comprender una o más formas de dosificación unitaria que comprendan un ingrediente activo. El paquete puede contener una lámina de metal o una lámina de plástico tal como un envase blister. El paquete o dispositivo dispensador puede venir adjunto con instrucciones para su administración.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser también proporcionada como un kit con otra composición farmacéutica útil para tratar y/o prevenir el cáncer. La composición farmacéutica que se puede combinar con la composición farmacéutica de la presente invención en el kit incluye, por ejemplo, agentes de terapia hormonal y agentes de terapia químicas, pero no se limita a los mismos. En las realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de la presente invención puede proporcionarse como un kit con otro agente de terapia hormonal. Por lo tanto, también está abarcado por la presente invención un kit que comprende la composición farmacéutica de la presente invención y otro agente de terapia hormonal. Alternativamente, la presente invención se refiere al uso de una combinación de (i) y (ii) que se describe a continuación en el tratamiento del cáncer que es positivo para el receptor de estrógeno, y en el que el polipéptido ERAP1 se expresa en un sujeto:

(i) uno o ambos de un agente de terapia hormonal y un agente de terapia química, y

(ii) cualquier ingrediente seleccionado de un grupo que consiste en los siguientes puntos (a) - (c);

(a) el péptido ERAP1 de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica el péptido; y

(c) una sal farmacéuticamente aceptable del péptido.

En las realizaciones preferidas de la presente invención, los ejemplos de cáncer que pueden ser una diana para el tratamiento incluyen el cáncer de mama humano.

El péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido se puede administrar directamente junto con un vehículo adecuado a un sujeto, o formularse en una forma de dosificación apropiada usando un método conocido para la preparación de un medicamento. Alternativamente, una sal farmacéuticamente aceptable del péptido de la presente invención puede también administrarse junto con un vehículo adecuado a un sujeto, o se puede formular para la administración como el péptido. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una forma adecuada para la administración oral, rectal, intranasal, local (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea, e intravenosa), o la administración por inhalación o soplado. Por ejemplo, según sea necesario, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral en forma de tabletas recubiertas de azúcar, una cápsula, un elixir, y una microcápsula, o puede administrarse parenteralmente en una forma de una inyección que es una solución esterilizada o suspensión con agua o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede mezclar junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio, agua esterilizada específicamente, solución salina fisiológica, aceite vegetal, un agente emulsionante, un agente de suspensión, un agente tensioactivo, un agente estabilizante, un agente aromatizante, un excipiente, un agente disolvente, un conservante, un agente de unión, etc., en una forma de dosificación unitaria que se requiere para su uso en un medicamento convencionalmente aceptado. La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia inerte que se utiliza como diluyente o agente disolvente para un fármaco. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, además del péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido.

Ejemplos de aditivos que pueden ser mezclados con una tableta y una cápsula incluyen agentes de unión (gelatina, almidón de maíz, goma de tragacanto y goma arábiga, etc.); excipientes (celulosa cristalina, etc.); agentes de expansión (almidón de maíz, gelatina y ácido algínico, etc.); lubricantes (estearato de magnesio, etc.); edulcorantes (sacarosa, lactosa, o sacarina); y agentes aromatizantes (menta, aceite Akamono, y cereza, etc.). Cuando la forma de dosificación unitaria sea una cápsula, también pueden abarcarse un vehículo líquido (aceite, etc.) adicionalmente en los ingredientes antes mencionados. Los ingredientes esterilizados para inyección pueden formularse usando un agente disolvente tal como agua destilada para inyección de acuerdo con el uso de la medicina convencional.

Otras soluciones isotónicas incluyendo solución salina fisiológica, así como adyuvantes tales como glucosa, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio se pueden usar como solución acuosa para inyección. Estas se pueden usar junto con agentes solubilizantes adecuados, tales como un alcohol, específicamente etanol, un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol y polietilenglicol) y un agente tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80 (marca registrada) y HCO-50)).

El aceite de sésamo o aceite de soja se pueden usar como solución oleosa, y se pueden usar junto con benzoato de bencilo o alcohol bencílico como agente solubilizante, y pueden formularse usando un tampón (tampón de fosfato y tampón de acetato de sodio, etc.); analgésicos (clorhidrato de procaína, etc.); un agente estabilizante (alcohol bencílico, fenol, etc.); y un antioxidante. La solución de inyección preparada se puede rellenar en una ampolla adecuada.

Una preparación farmacéutica adecuada para la administración oral incluye, pero no está limitado a, una cápsula, un sello, y un comprimido, que contiene una cantidad prescrita de un ingrediente activo, respectivamente. La preparación también incluye un medicamento, un líquido, un gel, un jarabe, una suspensión, una píldora, polvos, gránulos, una solución, una suspensión, una emulsión, etc. El ingrediente activo se administra opcionalmente en forma de bolo, pastilla, o pasta. El comprimido y la cápsula para la administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como un agente de unión, un extensor, un lubricante, un disgregante, y un agente humectante. El excipiente apropiado incluye, en particular, diluyentes, por ejemplo, azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa y carboximetil celulosa de sodio, y polivinilpirrolidona (PVP). Un desintegrador tal como pirrolidona de polivinilo de reticulación, agar, y ácido alginico o una sal del mismo, por ejemplo, alginato de sodio se puede añadir cuando sea necesario.

Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente junto con uno o más tipos de ingredientes de preparación. Un comprimido se puede preparar mediante la mezcla de un ingrediente activo en una forma libremente fluyente tal como polvos o gránulos, opcionalmente con un agente aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte, un lubricante, un agente tensioactivo o un dispersante, y comprimiendo la mezcla en una máquina apropiada. Un triturado en tableta puede fabricarse por moldeo de una mezcla de compuestos en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte en una máquina adecuada. Un comprimido se puede recubrir de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleosa, una solución, una emulsión, un jarabe, o un agente elixir, o se pueden proporcionar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como un agente de suspensión, un agente emulsionante, un vehículo no acuoso (aceite comestible puede ser abarcado), y un conservante.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen inyecciones acuosas y no acuosas estériles que pueden contener un antioxidante, un agente tampón, un bacteriostático y un soluto que hace que la sangre de un sujeto receptor sea isotónica con la preparación, y suspensiones acuosas y no acuosas esterilizadas que pueden contener un agente de suspensión y un espesante. La preparación se puede proporcionar como una carga en un recipiente, por ejemplo, una ampolla sellada o un vial en una dosis unitaria o dosis plural, y puede ser conservada en un estado liofilizado que puede ser simplemente añadido con un vehículo líquido esterilizado, por ejemplo, solución fisiológica y agua para inyección, justo antes de su uso. Alternativamente, la preparación puede proporcionarse como una infusión continua. Una solución de solubilización y suspensión para inyección instantánea se pueden preparar a partir de polvos esterilizados, gránulos, y tabletas como se describe anteriormente.

Las preparaciones para la administración rectal incluyen supositorios que utilizan vehículos convencionales tales como manteca de cacao o polietilenglicol. Las preparaciones para administrar vía intraoral, por ejemplo, administrar localmente vía bucal o sublingual incluyen una pastilla que comprende un ingrediente activo en una base saborizante tal como sacarosa, y goma arábica o goma de tragacanto, y un troche que comprende un ingrediente activo en una base tal como gelatina, glicerina, sacarosa o goma arábica. Un aerosol líquido o polvo dispersable o gotas se pueden utilizar con el fin de administrar por vía intranasal el ingrediente activo. Las gotas pueden ser prescritas mediante una base acuosa o no acuosa que también contenga uno o más tipos de dispersantes, agentes solubilizantes, o agentes de suspensión.

Para la administración por inhalación, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser administrada por un inhalador, un nebulizador, un paquete a presión, u otros medios apropiados para el suministro por pulverización con aerosol. El paquete a presión puede comprender agentes de pulverización apropiados (diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otros gases apropiados). Una unidad de dosificación en el aerosol a presión puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad fija. Alternativamente, en la administración por inhalación o soplado, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser una forma de una composición de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del péptido de la presente invención, y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. La composición en polvo se puede proporcionar en una forma de dosificación unitaria en, por ejemplo, una cápsula, un cartucho, gelatina, o un envase blíster, y los polvos se pueden administrar usando un inhalador o un soplador de la misma.

Se pueden utilizar las preparaciones descritas anteriormente adaptadas para liberar de forma sostenible el péptido de la presente invención según sea necesario. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener otros ingredientes activos tales como un agente antibacteriano, un agente inmunosupresor, o un conservante.

- 5 Debe entenderse que la preparación de la presente invención puede comprender otras sustancias convencionales en la técnica teniendo en cuenta la clase de preparación, además de los ingredientes descritos anteriormente. Por ejemplo, una preparación adecuada para administración oral puede comprender un agente aromatizante.

La composición farmacéutica de la presente invención se administra preferiblemente por vía parenteral en forma de inyección a fin de evitar que el ingrediente activo, es decir, el péptido o el polinucleótido sea digerido por el ácido gástrico o por alguna enzima intestinal. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante inyección intraarterial, inyección intravenosa, inyección intradérmica, inyección subcutánea o inyección intra-tumoral usando algún método bien conocido para el experto normal en la técnica. En las realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por inyección intravenosa en una forma en la que el ingrediente activo se incluye en un reactivo de entrega apropiado, tal como un liposoma. El recinto del ingrediente activo en un reactivo de suministro tal como un liposoma se puede realizar por algún método conocido para el experto normal en la técnica.

Cuando el ingrediente activo es un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener un vector para la terapia génica en la que se inserta el polinucleótido como ingrediente activo. En este caso, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un agente potenciador de la transfección apropiado con el fin de introducir el vector en la célula.

4. Método para determinar el pronóstico del cáncer

Como se muestra en los Ejemplos de la memoria descriptiva, la expresión del polipéptido ERAP1 se correlaciona significativamente con el período de supervivencia sin recaída de cáncer de mama (Ejemplo 7). Así, la presente descripción también proporciona un método para determinar el pronóstico de un paciente que tiene cáncer usando la expresión del polipéptido ERAP1 como un índice.

Específicamente, la presente descripción proporciona los métodos de [1] a [8] que se describen a continuación:

[1] un método para determinar el pronóstico de un paciente que tiene cáncer, que comprende las etapas (a) a (c) que se describen en (A) o (B) descritos a continuación:

(A)

30 (a) una etapa de detectar el nivel de expresión del gen ERAP1 en una muestra biológica recogida del sujeto;

(b) una etapa de comparar el nivel de expresión detectado en la etapa (a) con un nivel de control;

(c) una etapa de determinar el pronóstico del sujeto sobre la base de la comparación de la etapa (b);

(B)

(a) una etapa de aislar o recoger una muestra biológica derivada de un sujeto;

35 (b) una etapa de poner la muestra biológica derivada del sujeto en contacto con un oligonucleótido que se hibrida con el polinucleótido ERAP1, o un anticuerpo que se une al polipéptido ERAP1 para la detección, medición, o la determinación del nivel de expresión del gen ERAP1;

(c) una etapa de detección, medición, o determinación del nivel de expresión del gen ERAP1 sobre la base del contacto;

40 (d) una etapa de comparar el nivel de expresión detectado en la etapa (c) con un nivel de control; y

(e) una etapa de determinar el pronóstico del sujeto sobre la base de la comparación de la etapa (d);

[2] el método descrito en [1], en el que el nivel de control mencionado anteriormente es un buen nivel de control de pronóstico, y el aumento del nivel de expresión anteriormente mencionado en comparación con el nivel de control se determina como mal pronóstico;

45 [3] el método descrito en [1] o [2], en el que el nivel de expresión antes mencionado se obtiene por medio de uno de los métodos (a) o (b) descritos a continuación:

(a) detectar el ARNm que codifica el polipéptido ERAP1; y

(b) detectar el polipéptido ERAP1;

[4] el método descrito en [3], en el que el nivel de expresión antes mencionado se obtiene por tinción inmunohistoquímica;

[5] el método descrito en uno cualquiera de [1] a [4], en el que la muestra biológica antes mencionada es un espécimen extirpado de cáncer;

5 [6] el método descrito en uno cualquiera de [1] a [5], en el que el cáncer es positivo para el receptor de estrógeno;

[7] el método descrito en [6], en el que el cáncer es cáncer de mama; y

[8] el método descrito en uno cualquiera de [1] a [7], en el que el pronóstico a determinar es el de recaída después de cirugía.

10 En este documento, el término "pronóstico" representa una estimación con respecto al resultado esperado de la enfermedad, posibilidad de recuperación de la enfermedad, y la posibilidad de recaída de la enfermedad. Por lo tanto, se prescribe un pronóstico no bueno o mal pronóstico por la disminución del tiempo de vida o la tasa de supervivencia después del tratamiento o el aumento de la tasa de recaída después del tratamiento o la reducción del período de tiempo hasta la recaída. Por el contrario, se prescribe un buen pronóstico por el aumento del tiempo de vida o la supervivencia después del tratamiento, o la disminución de la tasa de recaída después del tratamiento o la extensión del período de tiempo hasta la recaída.

15 En este documento, la frase "determinar el pronóstico" incluye el análisis para la estimación y la expectativa del progreso del cáncer, en particular, con recaídas de cáncer, propagación de metástasis y recaídas de la enfermedad. El método para determinar el pronóstico de la presente descripción está destinado a ser utilizado clínicamente en la fabricación de conclusiones para el método de tratamiento, incluyendo la intervención terapéutica, los criterios del diagnóstico, por ejemplo, la clasificación de la etapa de la enfermedad, y el control de la enfermedad y la supervisión para la metástasis o recaída de la enfermedad neoplásica. En las realizaciones preferidas, el pronóstico estimado por el método de la presente invención puede ser la recaída después de la cirugía. Por lo tanto, por el método de la presente descripción, se hace posible estimar la posibilidad de cáncer recidivante en un paciente que ha recibido la cirugía de extirpación del cáncer.

20 El cáncer que se determina para el pronóstico por el método de la presente descripción es preferiblemente el cáncer positivo para el receptor de estrógeno. Los ejemplos de cáncer positivo para el receptor de estrógeno incluyen cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, y cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas, en particular), pero no se limitan a los mismos. En las realizaciones preferidas, el cáncer determinado para el pronóstico por el método de la presente descripción es el cáncer de mama.

30 La muestra biológica recogida de un paciente, que se utiliza en el método de la presente descripción, no está particularmente limitado, pero preferiblemente incluye células cancerosas derivadas del paciente. Los ejemplos preferidos de la muestra biológica incluyen especímenes de cáncer extirpado, extirpados por un procedimiento quirúrgico o similar. Por ejemplo, cuando el cáncer determinado para el pronóstico es el cáncer de mama, los ejemplos preferidos de la muestra biológica incluyen especímenes de cáncer de mama extirpados. La muestra biológica puede ser recogida de un paciente en diversos puntos de tiempo, incluyendo los tiempos antes, durante y después del tratamiento. Por ejemplo, las células de cáncer de mama derivadas de un paciente a ser determinadas para el pronóstico son particularmente preferidas como muestra biológica de la presente invención.

35 El "nivel de control" que se utiliza para la comparación en el método de la presente descripción puede ser el nivel de expresión del gen ERAP1 detectado antes de cualquier tipo de tratamiento, por ejemplo, en individuos o población de individuos que han mostrado un buen pronóstico de cáncer después del tratamiento. El nivel de control, en este caso, hace referencia en el presente documento al "nivel de control de buen pronóstico". Además, el "nivel de control" puede ser el nivel de expresión del gen ERAP1 detectado antes de cualquier tipo de los tratamientos en individuos o población de individuos que han mostrado mal pronóstico del cáncer después del tratamiento. En este caso, el nivel de control se denomina en este documento "bajo nivel de control pronóstico". El "nivel de control" puede ser un patrón de expresión único o patrones de expresión plurales derivados de una población de referencia única. Por lo tanto, el nivel de control se puede obtener basado en el nivel de expresión del gen ERAP1 detectado antes de cualquier tipo de los tratamientos en un paciente, o una población de pacientes cuyo pronóstico del cáncer ha sido conocido. Alternativamente, se utiliza un valor estándar del nivel de expresión del gen ERAP1 en un grupo de pacientes cuyo pronóstico se ha conocido. El valor estándar puede ser obtenido por cualquier método conocido en el campo técnico. Por ejemplo, un intervalo de media $\pm$ 2S.D. o media $\pm$ 3S.D. se puede utilizar como el valor estándar.

40 El nivel de control se puede obtener al mismo tiempo como una muestra biológica de prueba mediante el uso de las muestras recogidas y se conserva hasta el momento a partir de un paciente o de un grupo de pacientes cuyo pronóstico de cáncer se ha conocido antes de cualquier tipo de tratamiento.

55 Alternativamente, el nivel de control se puede obtener por un método estadístico sobre la base de los resultados obtenidos por análisis del nivel de expresión del gen ERAP1 en las muestras recogidas y conservadas hasta el momento a partir del grupo control. Además, el nivel de control puede ser una base de datos del patrón de expresión

de un grupo de pacientes recogidos hasta el momento cuyo pronóstico se ha conocido. Además, de acuerdo con una realización de la presente descripción, el nivel de expresión del gen ERAP1 en una muestra biológica derivada de un paciente puede compararse con múltiples niveles de control obtenidos a partir de múltiples muestras de referencia. En las realizaciones preferidas, se utiliza un nivel de control obtenido a partir de una muestra de

5 referencia que se deriva de la mismo tipo de tejido que la muestra biológica recogida de un paciente.

En el método de la presente descripción, cuando el nivel de expresión del gen ERAP1 en la muestra biológica derivada del paciente es similar a un buen nivel de control de pronóstico, el pronóstico del paciente se determina como bueno. Por otro lado, cuando el nivel de expresión del gen ERAP1 en la muestra biológica derivados del paciente aumenta en comparación con el buen nivel de control de pronóstico, el pronóstico del paciente se

10 determina como no bueno o malo. Además, cuando el nivel de expresión del gen ERAP1 en la muestra biológica derivada del paciente disminuye en comparación con el nivel de control de un mal pronóstico, el pronóstico del paciente se determina como bueno. Por otro lado, cuando el nivel de expresión del gen ERAP1 en la muestra biológica derivada del paciente es similar al nivel de control de un mal pronóstico, el pronóstico del paciente se determina como no bueno o malo. Los ejemplos preferidos de una muestra de control de buen pronóstico incluyen,

15 por ejemplo, células de cáncer de mama que se derivan de un paciente que ha demostrado buen pronóstico después del tratamiento. Alternativamente, los ejemplos preferidos de una muestra de control de mal pronóstico incluyen células de cáncer de mama que se derivan de un paciente que ha demostrado mal pronóstico.

El nivel de expresión del gen ERAP1 en una muestra biológica se puede considerar que ha cambiado (es decir, aumenta o disminuye) cuando el nivel de expresión del gen ERAP1 es diferente del nivel de control por 1,0 veces o

20 más, 1,5 veces o más, 2,0 veces o más, 5,0 veces o más, 10,0 veces o más, o superior.

La diferencia del nivel de expresión entre el nivel de una muestra biológica de prueba y el nivel de control puede normalizarse por el control, por ejemplo, de los genes constitutivos. Por ejemplo, un polinucleótido cuyo nivel de expresión se sabe que no es diferente entre células cancerosas y células no cancerosas (por ejemplo, actina β , gliceraldehído 3 fosfórico ácido deshidrogenasa, gen que codifica la proteína P1 de ribosoma) se puede utilizar para

25 normalizar el nivel de expresión del gen ERAP1.

El nivel de expresión se puede obtener mediante la detección de un producto de transcripción (ARNm) o producto de traducción (proteína) del gen ERAP1 en una muestra biológica recogida de un paciente usando un método conocido en el campo técnico.

Por ejemplo, el ARNm del gen ERAP1 se puede detectar por hibridación, por ejemplo, por análisis de hibridación de transferencia de Northern con una sonda que tenga una secuencia complementaria a la del ARNm. La detección se puede realizar en un chip o matriz. Alternativamente, un método de detección basado en la amplificación utilizando un cebador específico para ARNm del gen ERAP1, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) se puede utilizar en la detección. La sonda o el cebador específico para el gen ERAP1 pueden ser diseñados y preparados usando una técnica convencional haciendo referencia a toda la

30 secuencia de la secuencia de bases del gen ERAP1 (SEQ ID NO: 34). Por ejemplo, los cebadores usados en los Ejemplos (SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18) se pueden utilizar en la detección por RT-PCR, pero el cebador no se limita a ellos.

35

La sonda o el cebador usados en el método de la presente descripción se hibridan con el ARNm del gen ERAP1 bajo condiciones estrictas, de moderada a rigurosas, o bajo condiciones rigurosas. En este documento, la frase "condiciones (de hibridación) rigurosas" representa una condición donde la sonda o el cebador se hibridan con una secuencia diana, pero no se hibridan con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia, y varían en diversas circunstancias. La hibridación específica de una secuencia larga se observa a temperatura más alta que la hibridación específica de una secuencia corta. Generalmente, la temperatura de las condiciones rigurosas se seleccionan para que sea inferior a aproximadamente 5°C que el punto térmico de fusión (T_m) de una secuencia particular en la fuerza iónica y pH prescritos. La T_m es una temperatura a la que el 50% de una sonda complementaria a una secuencia diana se hibrida con la secuencia diana en el estado de equilibrio (en la fuerza iónica prescrita, pH y concentración de ácido nucleico). Generalmente, a la T_m , la secuencia diana está excesivamente presente, y el 50% de la sonda está ocupado en el estado de equilibrio. Típicamente, para las condiciones rigurosas, la concentración de las sales es menor que aproximadamente 1,0 M de ion sodio, típicamente

40 de aproximadamente 0,01 M a 1,0 M de ion sodio (o la sal) a un pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para un sonda corta o cebador (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos), y al menos aproximadamente 60°C para un sonda larga o cebador. Las condiciones rigurosas se pueden lograr mediante la adición de un agente de desestabilización, por ejemplo, formamida.

45

50

En el método de la presente descripción, un producto de traducción del gen ERAP1 puede ser también detectado para obtener el nivel de expresión del gen ERAP1. Por ejemplo, se puede obtener la cantidad del polipéptido ERAP1. Los ejemplos del método para la obtención de la cantidad del polipéptido ERAP1 como un producto de traducción incluyen un método de inmunoensayo utilizando un anticuerpo que reconozca específicamente el polipéptido ERAP1. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, cualquier fragmento o fragmento modificado (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv y similares) del anticuerpo se pueden utilizar

55 en la detección si el fragmento mantiene la capacidad de unión al polipéptido ERAP1. Un método para la

60

preparación de este tipo de anticuerpo es conocido en el campo técnico, y cualquier método puede ser utilizado para la preparación de tales anticuerpos y equivalentes del mismo.

En las realizaciones preferidas, el nivel de expresión del gen ERAP1 puede obtenerse mediante tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo para el polipéptido ERAP1. Un espécimen de cáncer extirpado se usa preferiblemente como muestra para la tinción inmunohistoquímica. La abundancia del polipéptido ERAP1 que se correlaciona con el nivel de expresión del gen ERAP1 puede evaluarse mediante la observación de la intensidad de la tinción inmunohistoquímica. Es decir, cuando el tejido de cáncer está casi uniforme y fuertemente teñido, indica que la abundancia del polipéptido ERAP1 es alta, y que el nivel de expresión del gen ERAP1 es alto. Por ejemplo, cuando el tejido del cáncer está casi uniforme y fuertemente teñido, se determina como positivo fuerte, y el pronóstico del paciente del que se recoge el tejido se puede determinar como no bueno.

Además, el método de la presente descripción también puede dar resultados intermedios además de otros resultados de prueba para determinar el pronóstico de un paciente. Tales resultados intermedios pueden ayudar a la determinación, la decisión o la predicción del pronóstico del paciente por un médico, una enfermera u otro terapeuta. Ejemplos de información adicional que se pueden considerar en combinación con los resultados intermedios obtenidos por la presente invención para determinar el pronóstico incluyen los síntomas clínicos y el estado corporal del paciente.

En otras palabras, el nivel de expresión del gen ERAP1 es un marcador pronóstico útil para evaluar, estimar o determinar el pronóstico de un sujeto afectado con cáncer positivo para receptores de estrógeno (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas, en particular)). Así, la presente descripción también proporciona un método para detectar un marcador pronóstico para la evaluación, la estimación, o determinación del pronóstico de un sujeto afectado con cáncer positivo para receptores de estrógeno, en donde el método comprende:

a) una etapa de detectar o medir el nivel de expresión del gen ERAP1 en una muestra biológica derivada de un sujeto, y

b) una etapa de correlacionar el nivel de expresión detectado o medido en la etapa a) con el pronóstico del sujeto.

Específicamente, de acuerdo con la presente descripción, el aumento del nivel de expresión en comparación con el nivel de control indica la posibilidad o sospecha de un mal pronóstico (tasa de supervivencia baja).

En otra realización del método de la presente descripción, la presente descripción proporciona además un método para detectar el nivel de expresión del gen ERAP1 en una muestra biológica obtenida de un paciente que tiene cáncer, como un marcador para determinar el pronóstico de un paciente que tiene cáncer. Cuando el nivel de expresión detectado del gen ERAP1 aumenta en comparación con el nivel de control de pronóstico bueno, indica que el pronóstico no es bueno o es malo para el paciente.

Además, en otra realización del método de la presente descripción, la presente descripción proporciona además el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un ácido nucleico complementario al ARNm del gen ERAP1 o el polipéptido ERAP1 en la fabricación de un reactivo para determinar el pronóstico de un paciente que tiene cáncer.

Además, en otra realización del método de la presente descripción, la presente descripción proporciona además un anticuerpo que se une específicamente a un ácido nucleico complementario al ARNm del gen ERAP1 o el polipéptido ERAP1 para determinar el pronóstico de un paciente que tiene cáncer.

5. Kit para evaluar el pronóstico de cáncer

La presente descripción proporciona un kit para evaluar o determinar el pronóstico de cáncer. Específicamente, el presente kit comprende al menos un reactivo para la detección de la expresión del gen ERAP1 en una muestra biológica derivada de un paciente, que se selecciona del grupo que se describe a continuación. El cáncer en la presente invención es preferiblemente un cáncer positivo para el receptor de estrógeno, más preferiblemente un cáncer de mama.

(a) un reactivo para la detección de ARNm del gen ERAP1

(b) un reactivo para detectar la proteína ERAP1

Ejemplos de un reactivo adecuado para la detección de ARNm del gen ERAP1 incluyen ácidos nucleicos que se unen específicamente al ARNm de ERAP1 o identifican el ARNm de ERAP1, tales como oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una porción del ARNm de ERAP1. Ese tipo de oligonucleótidos se ilustra por cebadores y sondas específicas para el ARNm de ERAP1. Ese tipo de oligonucleótidos se pueden preparar sobre la base de un método bien conocido en la técnica. El reactivo para la detección del ARNm de ERAP1 se puede inmovilizar sobre un sustrato sólido cuando sea necesario. Además, dos o más reactivos para la detección del ARNm de ERAP1 pueden estar contenidos en un kit.

La sonda o el cebador de la presente descripción comprenden típicamente oligonucleótidos sustancialmente purificados. El oligonucleótido comprende típicamente una secuencia de nucleótidos de cadena sentido consecutiva de al menos aproximadamente 2.000, 1.000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, o 25 de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia ERAP1, o una secuencia de nucleótidos de cadena antisentido de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia ERAP1, o una región de una secuencia de nucleótidos que se hibrida con un mutante de origen natural de estas secuencias bajo condiciones rigurosas. Específicamente, en las realizaciones preferidas, por ejemplo, un oligonucleótido que tiene una longitud de 5 a 50 se puede usar como cebador para amplificar el gen a detectar. Alternativamente, en un método de detección basado en la hibridación, se puede utilizar un polinucleótido que tiene una longitud de cientos de bases (por ejemplo, de aproximadamente 100 a 200) a una longitud de miles de bases (por ejemplo, de aproximadamente 1000 a 2000) como sonda (por ejemplo, ensayo de transferencia Northern o análisis de microarray de ADN).

Por otra parte, los ejemplos del reactivo adecuado para la detección de la proteína ERAP1 incluyen anticuerpos para la proteína ERAP1. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, se puede utilizar cualquier fragmento o forma modificada (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv y similares) del anticuerpo siempre y cuando el fragmento mantenga su capacidad de unión al polipéptido ERAP1. Los métodos para preparar tal tipo de anticuerpo para la detección de una proteína son bien conocidos en la técnica, y tales anticuerpos y el equivalente del mismo se pueden preparar usando cualquier método en la presente descripción. Además, el anticuerpo puede marcarse con moléculas de generación de señal por técnicas de enlace directo o marcaje indirecto. Los marcadores, los métodos para el marcaje de anticuerpos, y los métodos para detectar la unión de la diana a un anticuerpo son bien conocidos en la técnica, y cualquier marcador y cualquier método se pueden usar para la presente descripción. Además, pueden estar contenidos en el kit dos o más reactivos para detectar la proteína ERAP1.

El kit puede comprender uno o más de los reactivos mencionados anteriormente. Además, el kit puede comprender un sustrato sólido y un reactivo para la unión de la sonda al gen ERAP1 o el anticuerpo a la proteína ERAP1, un medio de cultivo y un recipiente para el cultivo de células, reactivos de control positivos y negativos, y un anticuerpo secundario para detectar anticuerpos para la proteína ERAP1. Por ejemplo, una muestra de tejido obtenida de un paciente que tiene buen pronóstico o mal pronóstico puede servir como reactivo de control útil. El kit de la presente descripción comprende un agente tampón, un diluyente, un filtro, una aguja, una jeringa, y una caja de un paquete que contiene instrucciones (por ejemplo, documentos, cintas, CD-ROM, etc.), y puede comprender además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y desde el punto de vista del usuario. Estos reactivos, etc., pueden estar contenidos en un recipiente adjunto a una etiqueta. Ejemplos de un recipiente apropiado incluyen una botella, un vial, y un tubo de ensayo. El recipiente puede estar formado a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico.

En una realización de la presente descripción, cuando el reactivo es una sonda para el ARNm de ERAP1, el reactivo puede inmovilizarse sobre un sustrato sólido tal como una tira porosa y puede ser formado al menos un sitio de detección. La región de medición o detección de la tira porosa puede comprender múltiples sitios que comprenden ácidos nucleicos (sonda), respectivamente. La tira de prueba también puede comprender sitios para el control negativo y/o positivo. Alternativamente, el sitio de control puede estar posicionado en otra tira distinta a la tira de prueba. Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácido nucleico inmovilizado. A saber, un primer sitio de detección puede contener mayor cantidad de ácido nucleico inmovilizado, y los siguientes sitios pueden contener cantidades más pequeñas de ácido nucleico inmovilizado. Cuando se añade una muestra de ensayo, se proporciona un índice cuantitativo para la cantidad del ARNm de ERAP1 presente en la muestra por el número de los sitios que presentan señal detectable. El sitio de detección puede estar constituido de cualquier forma detectable adecuada, y por lo general, tiene forma de rayas o de puntos en toda la anchura de la tira de prueba.

El kit de la presente descripción puede comprender además una muestra de control que muestra buen pronóstico, una muestra de control que muestra un mal pronóstico, o ambas. La muestra de control que muestra buen pronóstico puede ser, por ejemplo, una muestra derivada de un individuo o de una población que tiene un buen progreso después del tratamiento del cáncer. Por otra parte, la muestra de control que muestra un mal pronóstico puede ser una muestra derivada de un individuo o de una población que no tiene un buen progreso después del tratamiento del cáncer.

En las realizaciones preferidas, la muestra de control que muestra un buen pronóstico puede ser un tejido de cáncer clínico derivado de un paciente con cáncer que tiene un buen progreso después del tratamiento del cáncer. El cáncer es preferentemente cáncer positivo para receptores de estrógeno. Los ejemplos del cáncer positivo para receptores de estrógeno incluyen cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, y cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas, en particular), pero no se limitan a los mismos. Alternativamente, la muestra de control que muestra un buen pronóstico de la presente invención es preferiblemente una muestra que contiene una cantidad inferior de ARNm de ERAP1 o proteína que el valor de corte. El valor de corte en la presente invención se refiere a un valor que distingue un intervalo de buen pronóstico de un intervalo de mal pronóstico. El valor de corte se puede determinar usando, por ejemplo, la curva característica de funcionamiento del receptor (ROC). Una muestra estándar de ERAP1 de la presente descripción puede comprender una cantidad de ARNm de ERAP1 o el polipéptido correspondiente al valor de corte.

Por otra parte, la muestra de control que muestra un mal pronóstico puede ser un tejido de cáncer clínico derivado de un paciente con cáncer que no tiene un buen progreso después del tratamiento del cáncer. La muestra de control que muestra un mal pronóstico en la presente invención es preferiblemente una muestra que comprende una mayor cantidad de ARNm de ERAP1 o la proteína que el valor de corte.

5 6. Método para la detección del material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer

La presente descripción también proporciona un método para la detección de un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer.

Como se muestra en los ejemplos de la memoria descriptiva, la fosforilación de Ser39 de PHB juega un papel importante en la función de suprimir la activación de los receptores de estrógeno de PHB. Sin embargo, Ser39 fosforilado de PHB se defosforila por PP1 α a través de la unión a PP1 α vía ERAP1 (Ejemplo 8). Como consecuencia, la función de suprimir la activación de los receptores de estrógeno de PHB se reduce, y se promueve la proliferación de células cancerosas. Por lo tanto, por la inhibición de la unión de ERAP1 a PP1 α , la interacción entre PP1 α y PHB se inhibe. Como consecuencia, la defosforilación de PHB2 se puede suprimir, y por lo tanto PHB2 puede mantener su función de suprimir la activación de los receptores de estrógenos. Por lo tanto, una sustancia que inhibe la unión de ERAP1 a PP1 α puede ser un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer.

Además, como se muestra en los ejemplos de la memoria descriptiva, se confirmó que ERAP1 se fosforila por PKA y PKB, para acentuar la actividad de fosfatasa de PP1 α que está unido a ERAP1 (Ejemplo 8). Por lo tanto, la inhibición de la unión de PKA y PKB a ERAP1 inhibe la fosforilación de ERAP1, y suprime la aceleración de la actividad de fosfatasa de PP1 α . Como consecuencia, la defosforilación de PHB2 se puede suprimir y, por lo tanto, PHB2 puede mantener su función de suprimir la activación de los receptores de estrógenos.

De acuerdo con ello, la presente descripción proporciona un método para la detección de un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer mediante la inhibición de la unión del polipéptido ERAP1, y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, o el polipéptido PKB como un índice.

Ejemplos de la sustancia de ensayo seleccionados por el método de detección de la presente descripción incluyen cualquiera de los compuestos o composiciones que comprenden varios compuestos. Además, la sustancia de ensayo expuesta a una célula o proteína por el método de detección de la presente descripción puede ser un único compuesto o una combinación de compuestos. Cuando se utiliza una combinación de compuestos en el método de detección de la presente invención, los compuestos se pueden poner en contacto secuencialmente, o pueden ser puestos en contacto al mismo tiempo.

Por ejemplo, cualquier sustancia de ensayo se puede usar en el método de detección de la presente invención, tal como un extracto celular, un sobrenadante de cultivo celular, un producto microbiológico fermentado, un extracto de organismo marino, un extracto de planta, una proteína purificada o proteína bruta, un péptido, un compuesto no peptídico, un compuesto de micromolécula sintética (incluyendo constructos de ácidos nucleicos tales como ARN antisentido, siARN, ribozima, y aptámero y similares), y un compuesto de origen natural. La sustancia de ensayo de la presente descripción está disponible utilizando cualquier de los muchos enfoques de los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica. Los ejemplos de tal enfoque incluyen (1) la biblioteca biológica, (2) biblioteca de fase sólida paralela espacialmente direccionable o de fase líquida, (3) el método de la biblioteca sintética que demanda deconvolución, (4) método de biblioteca "un compuesto, una perla", y (5) el método de la biblioteca sintética que usa la selección por cromatografía de afinidad. El método de la biblioteca biológica que utiliza la selección por cromatografía de afinidad se limita a una biblioteca de péptidos. Los otros cuatro enfoques pueden aplicarse a la biblioteca de péptidos, la biblioteca de oligómeros no peptídicos, o la biblioteca de los compuestos de bajo peso molecular (Lam, Anticancer Drug Des 1997, 12: 145-67). Los ejemplos de métodos para la síntesis de la biblioteca molecular se pueden encontrar en la técnica (DeWitt et al, Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 6909-13; Erb et al, Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 11422-6; Zuckermann et al, J Med Chem 37: 2678-85, 1994; Cho et al, Science 1993, 261: 1303-5; Carell et al, Angew Chem Int Ed Engl 1994, 33: 2059; Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl 1994, 33: 2061; Gallop et al, J Med Chem 1994, 37: 1233-1251). La biblioteca de compuestos puede ser presentada en una solución (véase, Houghten, Bio/Techniques 1992, 13: 412-21), o sobre perlas (Lam, Nature 1991, 354: 82-4), en un chip (Fodor, Nature 1993, 364: 555-6), en bacterias (patente de EE.UU. n° 5.223.409), en esporas (Patentes de Estados Unidos N° 5.571.698; N° 5.403.484 y N° 5.223.409), en un plásmido (Cull et al, Proc Natl Acad. Sci USA 1992, 89: 1865-9), o en un fago (Scott and Smith, Science 1990, 249: 386-90; Devlin, Science 1990, 249: 404-6; Cwirla et al, Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 6378-82; Felici, J Mol Biol 1991, 222: 301-10; solicitud de patente de Estados Unidos N° 2002103360).

Los compuestos convertidos por añadir, deleccionar y/o sustituir una parte de la estructura de los compuestos seleccionados por el método de detección de la presente descripción están comprendidos en la sustancia de ensayo identificada por el método de detección de la presente descripción.

Además, cuando la sustancia de ensayo seleccionada sea una proteína, con el fin de obtener ADN que codifica la proteína, se puede determinar una secuencia completa de aminoácidos de la proteína para deducir la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. Alternativamente, el ADN que codifica la proteína se puede aislar mediante el

análisis de una secuencia parcial de aminoácidos de la proteína identificada, y la preparación como una sonda oligoDNA basada en la secuencia, y la detección de la biblioteca de ADNc utilizando la sonda. El ADN aislado puede ser utilizado en la preparación de una sustancia de ensayo que es un material candidato para tratar o prevenir el cáncer.

- 5 La sustancia de ensayo que se detecta en el método de detección de la presente descripción puede ser un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o puede ser un anticuerpo que se une específicamente a un péptido parcial que carece de la actividad biológica de la proteína original en vivo. Alternativamente, la sustancia de ensayo pueden ser péptidos dominantes negativos del polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB que se unen específicamente al sitio de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB. Alternativamente, la sustancia de ensayo pueden ser péptidos dominantes negativos del polipéptido ERAP1 que se unen específicamente al sitio de unión del polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o polipéptido PKB al polipéptido ERAP1.

- 10 La construcción de la biblioteca de la sustancia de ensayo es bien conocida en la técnica, y otras directrices para un método para identificar una sustancia de ensayo para el método de detección de la presente descripción, y la construcción de bibliotecas de sustancias de ensayo se muestran a continuación.

(I) Modelado molecular

- La construcción de la biblioteca de la sustancia de ensayo es fácil a partir del conocimiento de las estructuras moleculares de los compuestos que se sabe que tienen propiedades que se desean obtener, y/o las estructuras moleculares del polipéptido ERAP1, y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB. Como un método para la detección preliminar de una sustancia de ensayo adecuada, puede ser utilizado el modelado por ordenador para la interacción entre la sustancia de ensayo y la diana.

- La tecnología de modelado por ordenador permite la visualización de la estructura atómica tridimensional de una molécula seleccionada, y el diseño razonable de un nuevo compuesto que interactúa con la molécula. Una construcción de tres dimensiones depende típicamente del análisis cristalográfico por rayos X de la molécula seleccionada o de los datos de las imágenes por RMN. La dinámica molecular demanda datos del campo de fuerza. El sistema gráfico por ordenador permite la estimación de cómo un nuevo compuesto se une a una molécula diana, y la operación experimental de las estructuras del compuesto y la molécula diana sirven para perfeccionar la especificidad de la unión. Con el fin de estimar cómo cambia la interacción molécula-compuesto cuando se añade un pequeño cambio en uno de ellos o ambos, son necesarios un software de dinámica molecular y un ordenador del tipo de recogida de cálculos. Comúnmente están unidos a una interfaz con un modo de menú fácil de usar entre el programa de diseño molecular y el usuario.

- Ejemplos del sistema de modelado molecular descrito anteriormente incluyen el programa CHARMM y el programa QUANTA, Polygen Corporation, Waltham y Mass. CHARMM lleva a cabo la reducción al mínimo de energía y las funciones de la dinámica molecular. QUANTA lleva a cabo la construcción de la estructura molecular, modelado gráfico, y análisis. QUANTA permite la construcción interactiva, la alteración, la visualización y el análisis del comportamiento intermolecular.

- Muchos artículos se publican sobre el tema del modelado por ordenador de medicamentos que interactúan con una proteína particular. Ejemplos de los mismos incluyen Rotivinen et al. Acta Pharmaceutica Fennica 1988, 97: 159-66; Ripka, New Scientist 1988, 54-8; McKinlay & Rossmann, Annu Rev Pharmacol Toxicol 1989, 29: 111-22; Perry & Davies, Prog Clin Biol Res 1989, 291: 189-93; Lewis & Dean, Proc R Soc Lond 1989, 236: 125-40, 141-62; y Askew et al, J Am Chem Soc 1989, 111: 1082-1090, que se relaciona con un modelo de receptor de ingredientes de ácido nucleico.

- Otros programas de ordenador para la detección y que ilustran sustancias químicas están disponibles de compañías tales como Biodesign, Inc. (Pasadena, Calif.), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canadá), y Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario). Por ejemplo, véase Desjarlais et al, J Med Chem 1988, 31: 722-9; Meng et al, J Chem Computer 1992, 13: 505-24; Meng et al, Proteins 1993, 17: 266-78; Shoichet et al, Science 1993, 259: 1445-1450.

- Si se identifica un inhibidor deducido, se puede utilizar la tecnología de la química combinatoria para la construcción de muchas variantes basadas en la estructura química del inhibidor identificado, deducido, como se detalla a continuación. La biblioteca de los inhibidores deducidos, o "sustancias de ensayo" obtenidas como consecuencia, se puede cribar utilizando el método de la presente descripción para identificar un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer.

(ii) Síntesis química combinatoria

- Una biblioteca combinatoria de sustancias de ensayo se puede fabricar como una parte de un programa de diseño de fármacos razonable, que comprende el conocimiento de la estructura del núcleo presente en un inhibidor conocido. Este enfoque permite que se mantenga un tamaño moderado de la biblioteca para facilitar la detección a alto rendimiento. Alternativamente, simplemente por la síntesis de permutación completa de una familia molecular que constituye la biblioteca, es posible construir una simple biblioteca, especialmente corta, de moléculas de

polímero. Un ejemplo de este último enfoque es una biblioteca de un péptido completo que tiene 6 aminoácidos de longitud. Tal biblioteca de péptidos puede comprender todas las permutaciones de la secuencia de 6 aminoácidos. A este tipo de biblioteca se denomina biblioteca química combinatoria lineal.

La fabricación de la biblioteca por química combinatoria es bien conocida para los expertos normales en la técnica, y se puede realizar tanto por síntesis química como por síntesis biológica. Ejemplos de la biblioteca química combinatoria incluyen una librería de péptidos (por ejemplo, véase la Patente de EE.UU. No. 5.010.175; Furka, *Int J Pept Prot Res* 1991, 37: 487-93; Houghten et al, *Nature* 1991, 354: 84-6), pero no se limitan a los mismos. Pueden ser utilizadas otras técnicas químicas para la fabricación de bibliotecas de diversidad química. Ejemplos de tales técnicas químicas incluyen péptidos (por ejemplo, el documento WO91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, el documento W093/20242), biooligómeros al azar (por ejemplo, el documento WO92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.288.514), diversómeros tales como hidantoína, benzodiazepinas y dipéptidos (DeWitt et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 6909-13), polipéptido viniloga (Hagihara et al, *J Amer Chem Soc* 1992, 114: 6568), péptidos miméticos no peptídicos con una estructura de glucosa (Hirschmann et al, *J Amer Chem Soc* 1992, 114: 9217-8), compuestos orgánicos análogos de una biblioteca de compuestos de bajo peso molecular (Chen et al, *J. Amer Chem Soc* 1994, 116: 2661), oligocarbamatos (Cho et al., *Science* 1993, 261: 1303), y/o fosfonato de peptidilo (Campbell et al, *J Org Chem* 1994, 59: 658), una biblioteca de ácidos nucleicos (véase Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology* 1995 suplemento; Sambrook et al, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EE.UU.), una biblioteca de ácidos nucleicos de péptido (por ejemplo, véase la Patente de EE.UU. No. 5.539.083), una biblioteca de anticuerpos (por ejemplo, véase Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 1996, 14 (3): 309-14 y el documento WO97/271), una biblioteca de hidratos de carbono (por ejemplo, véase Liang et al, *Science* 1996, 274: 1520-1522; Patente de Estados Unidos No. 5.593.853), y una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (por ejemplo, véase benzodiazepinas, Gordon EM. *Curr Opin Biotechnol.* 1995 Dec 1; 6 (6): 624-31; isoprenoides, Patente de Estados Unidos No. 5.569.588; tiazolidinona y metatiazanona, Patente de Estados Unidos No. 5.549.974; pirrolidina, Patente de Estados Unidos No. 5.525.735 y No. 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de EE.UU. No. 5.506.337; benzodiazepinas, Patente de Estados Unidos No. 5.288.514 y similares), pero no se limita a los mismos.

Hay dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias comercializados (por ejemplo, véase 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville KY), Symphony (Rainin, Woburn, MA), 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA), 9050 Plus (Millipore, Bedford, MA)). Por otra parte, la propia biblioteca combinatoria también se comercializa en grandes cantidades (por ejemplo, véase ComGenex, Princeton, NJ, Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD y similares).

(iii) Otros candidatos

Otro enfoque utiliza un bacteriófago recombinante para la fabricación de la biblioteca. Mediante el uso del "método de fago" (Scott & Smith, *Science* 1990, 249: 386-90; Cwirla et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 6378-82; Devlin et al, *Science* 1990, 249: 404- 6), es posible construir una biblioteca muy grande (por ejemplo, de 106 a 108 sustancias químicas). Un segundo enfoque utiliza principalmente métodos químicos, por ejemplo, el método de Geysen (Geysen et al, *Molecular Immunology* 1986, 23: 709-15; Geysen et al, *J Immunologic Method* 1987, 102: 259-74); y el método de Fodor et, al. (*Science* 1991, 251: 767-73). Furka et, al. (14º Congreso Internacional de Bioquímica 1988, Volumen Nº 5, Resumen FR: 013; Furka, *Int J Peptide Protein Res* 1991, 37: 487-93), Houghten (Patente de Estados Unidos Nº 4.631.211), y Rutter et al. (Patente de Estados Unidos No. 5.010.175) describen métodos para la fabricación de una mezcla de péptidos que puede ser probada como agonista o antagonista.

Un aptámero es una macromolécula que consiste en ácidos nucleicos, que se une fuertemente a una diana molecular particular. Tuerk y Gold (*Science* 249: 505-510 (1990)) describen el método SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para seleccionar un aptámero. En el método SELEX, una gran biblioteca de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, 1015 moléculas diferentes) se puede utilizar en la detección.

(vi) Método para la detección de sustancias que disminuyen el nivel de unión entre el polipéptido ERAP1 y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB

Como se ha descrito anteriormente, la presente descripción proporciona un material candidato para la supresión de la proliferación de células cancerosas, o un método para la detección de un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer mediante la inhibición de la unión entre el polipéptido ERAP1 y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB como un índice. Un cáncer al que se puede aplicar los materiales candidatos identificados por el método de detección de la presente descripción es el cáncer en el que el polipéptido ERAP1 se expresa, más preferiblemente es un cáncer positivo para el receptor de estrógeno. Ejemplos de tales cánceres incluyen, por ejemplo, el cáncer de mama. Además, por el material candidato identificado por el método de detección de la presente descripción es posible suprimir eficazmente la proliferación de particularmente células de cáncer dependientes de estrógenos.

Más específicamente, el método de la presente descripción comprende las etapas descritas a continuación:

(a) una etapa de poner el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo en contacto con el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKB o el polipéptido PKA, o un equivalente funcional del mismo en presencia de una sustancia de ensayo;

(b) una etapa de detectar el nivel de unión entre los polipéptidos antes mencionados en (a); y

- 5 (c) una etapa de seleccionar una sustancia de ensayo que disminuye el nivel de unión entre los polipéptidos mencionados anteriormente, en comparación con el nivel de unión detectado en ausencia de la sustancia de ensayo.

Por el método de la presente descripción es posible evaluar el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas o efectos terapéuticos sobre el cáncer de una sustancia de ensayo que se somete a la detección. Así, la presente descripción también proporciona un método para evaluar el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas o el efecto del tratamiento o la prevención para el cáncer de una sustancia de ensayo.

Más específicamente, el método mencionado anteriormente comprende las etapas descritas a continuación:

(a) una etapa de poner el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo en contacto con el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo en presencia de una sustancia de ensayo;

- 15 (b) una etapa de detectar el nivel de unión entre los polipéptidos antes mencionados en (a);

(c) una etapa de comparar el nivel de unión entre los polipéptidos mencionados anteriormente detectados en (b) con el nivel de unión detectado en ausencia de la sustancia de ensayo; y

- 20 (d) una etapa de correlacionar la tasa de disminución del nivel de unión entre los polipéptidos anteriormente mencionados por la sustancia de ensayo obtenida por la comparación en (c), con el efecto de supresión sobre la proliferación de células cancerosas o el efecto del tratamiento o la prevención del cáncer de la sustancia de ensayo.

Por ejemplo, cuando una sustancia de ensayo disminuye el nivel de unión del polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo en comparación con el nivel de unión detectado en ausencia de la sustancia de ensayo, la sustancia de ensayo puede ser identificada o seleccionada como material candidato que tiene el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas o el efecto del tratamiento o la prevención de cáncer. Alternativamente, cuando una sustancia de ensayo no disminuye el nivel de unión del polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo en comparación con el nivel de unión detectado en ausencia de la sustancia de ensayo, la sustancia de prueba puede ser identificada como una sustancia que no tiene ningún efecto significativo sobre la supresión de la proliferación de células de cáncer, o una sustancia que no tiene ningún efecto significativo sobre el tratamiento o la prevención del cáncer.

La expresión "equivalente funcional del polipéptido ERAP1" que se utiliza para el método de detección de la presente invención se refiere a un mutante del polipéptido ERAP1, un polipéptido fragmento, un mutante de un polipéptido fragmento, y un polipéptido marcado del mismo y similares que mantienen la capacidad de unión al polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, o el polipéptido PKB. Por lo tanto, cuando la inhibición de la unión con el polipéptido PP1 α se utiliza como un índice, el equivalente funcional del polipéptido ERAP1 es un mutante del polipéptido ERAP1, un polipéptido fragmento, un mutante de un polipéptido fragmento, y un polipéptido marcado del mismo y similares que mantienen la capacidad de unión al polipéptido PP1 α . Ejemplos de tales equivalentes funcionales de ERAP1 incluyen los polipéptidos que comprenden un dominio de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PP1 α . Específicamente, los ejemplos de tales equivalentes funcionales incluyen polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 66, o el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 67.

Además, cuando la inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 y el polipéptido PKA se utiliza como índice, el equivalente funcional del polipéptido ERAP1 es un mutante del polipéptido ERAP1, un polipéptido fragmento, un mutante de un polipéptido fragmento, y un polipéptido marcado del mismo y similares que mantienen la capacidad de unión al polipéptido de PKA. Ejemplos de tales equivalentes funcionales del polipéptido ERAP1 incluyen los polipéptidos que comprenden un dominio de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PKA. Además, cuando la inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 y el polipéptido PKB se utiliza como índice, el equivalente funcional del polipéptido ERAP1 es un mutante del polipéptido ERAP1, un polipéptido fragmento, un mutante de un polipéptido fragmento, y un polipéptido marcado del mismo y similares que mantienen la capacidad de unión al polipéptido PKB. Ejemplos de tales equivalentes funcionales de ERAP1 incluyen los polipéptidos que comprenden un dominio de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PKB.

Además, la expresión "equivalente funcional del polipéptido PP1 α " que se utiliza para el método de detección de la presente invención se refiere a un mutante del polipéptido PP1 α , un polipéptido fragmento, un mutante de un polipéptido fragmento, y un polipéptido marcado de los mismos y similares que mantienen la capacidad de unión al

polipéptido ERAP1. Ejemplos de tales equivalentes funcionales del polipéptido PP1 α incluyen los polipéptidos que comprenden un dominio de unión del polipéptido PP1 α o al polipéptido ERAP1.

Además, la expresión "equivalente funcional del polipéptido PKA" que se utiliza para el método de detección de la presente descripción se refiere a un mutante del polipéptido PKA, un polipéptido fragmento, un mutante de un polipéptido fragmento, y un polipéptido marcado de los mismos y similares que mantienen la capacidad de unión al polipéptido ERAP1. Ejemplos de tales equivalentes funcionales del polipéptido PKA incluyen polipéptidos que comprenden un dominio de unión del polipéptido PKA al polipéptido ERAP1.

Además, la expresión "equivalente funcional del polipéptido PKB" que se utiliza para el método de detección de la presente descripción se refiere a un mutante del polipéptido PKB, un polipéptido fragmento, un mutante de un polipéptido fragmento, y un polipéptido marcado de los mismos y similares que mantienen la capacidad de unión al polipéptido ERAP1. Ejemplos de tales equivalentes funcionales del polipéptido PKB incluyen polipéptidos que comprenden un dominio de unión del polipéptido PKB al polipéptido ERAP1.

Como se describe en el punto "1. Péptido ERAP1", la alteración de uno, dos, o varios aminoácidos en una proteína generalmente no tiene influencia en las funciones de la proteína. Por lo tanto, los equivalentes funcionales del polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA y el polipéptido PKB pueden ser polipéptidos que comprendan secuencias de aminoácidos en las que se sustituyan, eliminen, inserten y/o añadan uno, dos, o varios residuos de aminoácidos, en las secuencias de aminoácidos del polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, y el polipéptido PKB, respectivamente. Estos equivalentes funcionales pueden ser los que comprendan la secuencia de aminoácidos que tengan una homología (también llamada "una identidad de secuencia") de al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente de 90% a 95%, más aun preferentemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% con respecto al polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, y el polipéptido PKB, respectivamente. El "% de homología" (también llamado "% de identidad") puede ser típicamente calculado en base a la comparación entre dos secuencias alineadas de manera óptima. Los métodos para la comparación de la alineación de secuencias son muy conocidos en la técnica. La alineación óptima de la secuencia y la comparación se puede implementar usando un algoritmo, por ejemplo, "Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726-30 (1983)".

El número de mutaciones de aminoácidos no está particularmente limitado, siempre y cuando la capacidad de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, o el polipéptido PKB se mantenga, o siempre que la capacidad de unión del polipéptido PP1 α , la polipéptido PKA, o el polipéptido PKB al polipéptido ERAP1 se mantenga. Sin embargo, el número de mutaciones de aminoácidos es generalmente preferiblemente 5% o menos de la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, en las realizaciones preferidas, el número de residuos de aminoácidos mutados en los equivalentes funcionales de los polipéptidos anteriormente mencionados puede ser de 30 aminoácidos o menos, 20 aminoácidos o menos, 10 aminoácidos o menos, 5 ó 6 aminoácidos o menos, o 3 ó 4 aminoácidos o menos.

Además, cuando el tipo de mutación de aminoácido es una "sustitución", la sustitución es preferiblemente una sustitución de aminoácidos conservadora. Sin embargo, la sustitución puede ser una sustitución de aminoácidos no conservadora, siempre que la capacidad de unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB se mantenga, o siempre que la capacidad de unión del polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, o el polipéptido PKB al polipéptido ERAP1 se mantenga.

Alternativamente, los equivalentes funcionales del polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, y el polipéptido PKB pueden ser codificados por polinucleótidos que se hibridan, respectivamente, a los polinucleótidos naturales de cada uno del gen ERAP1, el gen PP1 α , el gen de PKA, y el gen PKB bajo condiciones rigurosas.

La expresión "condiciones rigurosas (hibridación)" significa una condición en la que una molécula de ácido nucleico típicamente se hibrida con una secuencia diana en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero que no se hibrida con otras secuencias en un grado detectable. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia, y varían dependiendo de condiciones tales como la fuerza iónica, el pH y la concentración de los ácidos nucleicos. A medida que la secuencia es más larga, la temperatura de hibridación específica será mayor. Una pauta general para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridation with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridation and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Las condiciones rigurosas se seleccionan comúnmente de manera que sean de aproximadamente 5 a 10°C más baja que el punto de fusión térmico (T_m) de una secuencia particular en la fuerza iónica y el pH prescritos. La T_m es una temperatura a la que el 50% de una sonda complementaria a una diana se hibrida con una secuencia diana en el estado de equilibrio (bajo una fuerza iónica prescrita, pH, y concentración de ácido nucleico) (ya que la secuencia diana está excesivamente presente, el 50% de la sonda está ocupada en el estado de equilibrio a la T_m). Las condiciones rigurosas se pueden realizar mediante la adición de un agente de desestabilización, tal como la formamida. En la hibridación selectiva o hibridación específica, la señal positiva es al menos 2 veces la señal de hibridación de fondo, y preferiblemente 10 veces la señal de hibridación de fondo. Son posibles condiciones de hibridación rigurosas ejemplares como las que se describen a continuación: 50% de formamida, 5 x SSC, y 1% de SDS, incubación a 42°C, o 5 x SSC, 1% de SDS, incubación a 65°C, 0,2 x SSC y 0,1% SDS, y lavado a 50°C.

Las condiciones de hibridación para aislar el ADN que codifica el polipéptido funcionalmente equivalente con respecto al polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, y el polipéptido de PKB se pueden seleccionar de acuerdo con los métodos ordinarios por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, la hibridación puede llevarse a cabo mediante la realización de una prehibridación durante 30 minutos o más a 68°C usando "tampón RAPID-Hyb" (Amersham LIFE SCIENCE), añadiendo una sonda de marcado, y con calentamiento durante 1 hora o más a 68°C. La siguiente etapa de lavado se puede realizar, por ejemplo, bajo condiciones rigurosas bajas. Los ejemplos de condiciones rigurosas bajas incluyen 42°C, 2 x SSC y 0,1% de SDS, y 50°C, 2 x SSC y 0,1% de SDS. Alternativamente, la siguiente etapa de lavado se puede realizar de manera más adecuada bajo condiciones rigurosas altas. Los ejemplos de condiciones rigurosas altas incluyen, por ejemplo, tres lavados en 0,01% de SDS durante 20 minutos a temperatura ambiente y 2 x SSC, y luego tres lavados en 0,1% de SDS a 37°C durante 20 minutos y 1 x SSC, y dos lavados en 0,1% de DSD a 50°C durante 20 minutos y 1 x SSC. Sin embargo, varios factores tales como la temperatura y la concentración de la sal pueden tener influencia en la rigurosidad de la hibridación. Estos factores los pueden seleccionar apropiadamente para lograr la necesaria condición rigurosa los expertos normales en la técnica.

La expresión "polipéptido marcado" que se utiliza para el método de detección de la presente invención se refiere a un polipéptido en el que se añade cualquier epítipo de un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad clara para el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido. Como tal epítipo, se puede usar un sistema de epítipo-anticuerpo disponible comercialmente (Experimental Medicine 1995, 13: 85-90). Por ejemplo, se pueden usar adecuadamente como marcadores (Experimental Medicine 13: 85-90 (1995) β -galactosidasa, proteína unida a maltosa, glutatión S-transferasa (GST), proteína de fluorescencia verde (GFP), polihistidina (His-tag), agregado de la gripe HA, c-myc humano, FLAG, glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-GP), el gen T7 10 proteína (T7-tag), glicoproteína del virus del herpes simple humano (HSV-tag), E-tag (epítipo en un fago monoclonal) y similares.

El polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA y el polipéptido de PKB, y equivalentes funcionales de los mismos pueden fabricarse utilizando métodos bien conocidos para los expertos ordinarios en la técnica tales como los descritos en "1. Péptido ERAP1". En las realizaciones preferidas, el polipéptido anteriormente mencionado usado en el método de detección de la presente descripción es aislado, y purificado.

Además, el polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA y el polipéptido de PKB, y equivalentes funcionales de los mismos que se utilizan en el método de detección de la presente descripción pueden estar ligados a otra sustancia, siempre y cuando se mantenga la capacidad de unión. Ejemplos de sustancias que se pueden unir incluyen péptidos, lípidos, azúcares y cadenas de azúcar, grupos acetilo, y polímeros de origen natural y sintéticos. La unión de estas sustancias puede ser implementada para impartir funciones adicionales al polipéptido, o para la estabilización del polipéptido.

Como método para seleccionar sustancias que inhiben la unión entre el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o equivalentes funcionales de los mismos, pueden ser usados los métodos bien conocidos para los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, dicha detección puede ser implementada por un sistema de ensayo in vitro. Más específicamente, primero, el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo se une a un soporte, y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo se añade junto con una sustancia de prueba. A continuación, se incuba la mezcla, y después se lava, y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo que se une al soporte se detecta o se mide. Una sustancia de ensayo que disminuye la cantidad detectada del polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo puede seleccionarse como material candidato para la supresión de la proliferación de células cancerosas, y/o un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer.

Alternativamente, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo puede ser unido a un soporte, y el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo pueden ser añadidos a ello junto con una sustancia de ensayo. En este caso, una sustancia de ensayo que disminuye la cantidad detectada del polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo puede seleccionarse como material candidato para la supresión de la proliferación de células cancerosas, y/o un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer.

Ejemplos del soporte que se pueden utilizar para la unión del polipéptido antes mencionado incluyen polisacáridos insolubles, tales como agarosa, celulosa y dextrano; y resinas de síntesis tales como amida poliacrítica, poliestireno y silicona. Perlas y placas preparadas a partir de los materiales mencionados anteriormente (por ejemplo, placas de múltiples pocillos, chips biosensores y similares) disponibles comercialmente pueden ser utilizados adecuadamente. Cuando se utilizan perlas, las perlas pueden rellenar una columna. Alternativamente, si se utilizan perlas magnéticas conocidas en la técnica de manera similar, los polipéptidos que se unen en las perlas pueden ser fácilmente aislados por imanes.

La unión del polipéptido al soporte se puede implementar mediante un método conocido en la técnica tal como la unión química y la adsorción física. Alternativamente, el polipéptido puede estar unido al soporte a través de un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido. Además, cuando el polipéptido es un polipéptido marcado, el polipéptido marcado puede unirse al soporte a través de un anticuerpo que reconoce específicamente al

marcador. Además, la unión del polipéptido al soporte puede ser también implementada por avidina y biotina. La unión entre los polipéptidos se puede implementar en un tampón tal como un tampón fosfato o tampón Tris, siempre que el tampón no inhiba la unión entre los polipéptidos.

5 Como un medio para detectar o cuantificar la unión entre los polipéptidos, puede ser utilizado un biosensor que utilice fenómenos de resonancia de plasmones de superficie. Cuando se usa tal biosensor, la unión entre los polipéptidos se puede observar a tiempo real como la señal de resonancia de plasmón superficial usando una cantidad en trazas de los polipéptidos sin el marcado (por ejemplo, BIAcore, Pharmacia). Luego, usando un biosensor tal como BIAcore, puede ser evaluada la unión entre los polipéptidos.

10 Alternativamente, el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo se puede marcar, y el marcador se puede utilizar para detectar o medir la unión entre los polipéptidos. Alternativamente, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo se pueden marcar, y el marcador se puede utilizar para detectar o medir la unión entre los polipéptidos. Específicamente, se marca uno de los polipéptidos a detectar para la unión y, a continuación, el polipéptido marcado se pone en contacto con el otro polipéptido en presencia de una sustancia de ensayo. Luego, después del lavado, el polipéptido unido se detecta o se mide por el marcador. Una sustancia marcadora tal como un radioisótopo (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, β -glucosidasa), una sustancia fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina) y biotina/avidina se pueden usar para el marcado del polipéptido en el presente método. Cuando el polipéptido está marcado por un radioisótopo, la detección o medición del polipéptido marcado unido puede ser implementada por centelleo líquido. Cuando el polipéptido está marcado por una enzima, se añade un sustrato para la enzima. Posteriormente, puede ser detectado el cambio del sustrato por la enzima, tal como el desarrollo de un color por un absorciómetro y similares, por medio del cual se detecta o mide el polipéptido marcado que está unido. Además, cuando se utiliza una sustancia fluorescente como marcador, el polipéptido marcado unido puede detectarse o medirse usando un fotómetro de fluorescencia.

25 Además, la unión entre el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo puede detectarse o medirse usando un anticuerpo para el polipéptido ERAP1, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo. Por ejemplo, el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo inmovilizado sobre un soporte se pone en contacto con el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo junto con una sustancia de ensayo. A continuación, se incuba la mezcla. Después, la mezcla se lava, y el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo que se une al polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo puede detectarse o medirse usando un anticuerpo para el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA, o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo.

35 Alternativamente, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo se inmoviliza sobre un soporte, y se pone en contacto con el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo junto con una sustancia de ensayo. Entonces, el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo que se une al polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo puede detectarse o medirse usando un anticuerpo para el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo. Cuando se utiliza un anticuerpo en el método de detección de la presente invención, preferiblemente, el anticuerpo está marcado por una de las sustancias de marcado mencionadas anteriormente, y puede ser detectado o medido en base a la sustancia de marcado. Alternativamente, un anticuerpo para el polipéptido mencionado anteriormente puede ser utilizado como un anticuerpo primario que se detecta mediante un anticuerpo secundario marcado con una sustancia marcadora. Además, cuando se utiliza un anticuerpo, el anticuerpo que se une al polipéptido puede detectarse o medirse usando una columna de proteína G o una columna de proteína A.

45 Alternativamente, en otras realizaciones, puede ser utilizado el sistema de dos híbridos que utiliza células ("sistema de dos híbridos MATCHMAKERTM", "kit de ensayo de dos híbridos de mamíferos MATCHMAKERTM", "sistema de un solo híbrido MATCHMAKERTM" (Clontech); "sistema dos-híbrido vectorial HybriZAP" (Stratagene); referencia del documento "Dalton and Treisman, Cell 68: 597-612 (1992)", "Fields and Sternglanz, Trends Genet 10: 286-92 (1994)").

50 En el sistema de dos híbridos, por ejemplo, el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo se fusiona con una región de unión de SRF o región de unión de GAL4. A continuación, el producto resultante se expresa en células de levadura. El polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo se fusiona con la región de activación transcripcional de VP16 o GAL4. A continuación, el producto resultante se expresa de manera similar en células de levadura en presencia de una sustancia de ensayo. Alternativamente, el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo se fusiona con la región de unión a SRF o la región de unión a GAL4. Además, el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo se puede fusionar con la región de activación transcripcional de VP16 o GAL4. La unión del polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo con el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo permite la activación de un gen indicador y la detección de un clon positivo. Como gen indicador pueden ser utilizados, por ejemplo, el gen Ade2, gen lacZ, gen CAT, gen de luciferasa y similares, además del gen HIS3.

La expresión "disminución del nivel de unión" que se utiliza para el método de detección de la presente invención se refiere a disminuir el nivel de unión entre los polipéptidos por al menos 10% o más, preferiblemente 25% o más, más preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 75 %, 80%, 85%, 90% o 95% o más en comparación con el nivel de unión detectado en ausencia de una sustancia de ensayo. Así, cuando la sustancia de ensayo disminuye el nivel de unión entre los polipéptidos en al menos un 10% o más, la sustancia de ensayo se caracteriza como una sustancia "que disminuye el nivel de unión".

El material candidato identificado o seleccionado por el método de detección de la presente descripción puede evaluarse adicionalmente por pruebas para el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas o el efecto del tratamiento o la prevención del cáncer. Por lo tanto, el método de detección de la presente descripción puede comprender los pasos que se describen a continuación:

(a) una etapa de poner el polipéptido ERAP1 o un equivalente funcional del mismo en contacto con el polipéptido PP1 α , el polipéptido PKA o el polipéptido PKB, o un equivalente funcional del mismo en presencia de una sustancia de ensayo;

(b) una etapa de detectar el nivel de unión entre los polipéptidos antes mencionados en (a); y

(c) una etapa de seleccionar una sustancia de ensayo que disminuye el nivel de unión entre los polipéptidos mencionados anteriormente, en comparación con el nivel de unión detectado en ausencia de la sustancia de ensayo;

(d) una etapa de confirmar el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas con respecto a la sustancia de ensayo seleccionada en (c); y

(e) una etapa de seleccionar la sustancia de ensayo confirmada para el efecto de supresión de la proliferación de las células cancerosas en (d) como una sustancia para la supresión de la proliferación de células cancerosas, o un material candidato para tratar y/o prevenir el cáncer.

La confirmación para el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas se puede realizar mediante una prueba in vitro o prueba in vivo. En las realizaciones preferidas, las células cancerosas que se pueden utilizar en dicha prueba in vitro y prueba in vivo son células cancerosas positivas para el receptor de estrógeno en las que se expresa el polipéptido ERAP1. Ejemplos de tales células de cáncer incluyen células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógeno. Además, el efecto de supresión de la proliferación de células de cáncer evaluado en el ensayo in vitro o ensayo in vivo es, preferiblemente, el efecto de supresión sobre la proliferación celular dependiente de estrógenos.

Con respecto al material candidato identificado o seleccionado, puede ser implementado el ensayo in vitro para confirmar el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas. En este ensayo in vitro, por ejemplo, células cancerosas o células normales se cultivan en presencia del material candidato, y se mide la velocidad de proliferación. Del mismo modo, la prueba in vitro se puede implementar para evaluar el efecto de supresión sobre la proliferación celular dependiente de estrógenos. En este caso, las células cancerígenas son tratadas con estrógenos, y después se cultivan en presencia del material candidato. Alternativamente, las células cancerosas se cultivan en presencia de estrógenos y el material candidato. A continuación, se mide la velocidad de proliferación de las células cancerosas. La prueba in vivo puede ser implementada con respecto al material candidato identificado o seleccionado para confirmar el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas. En este ensayo in vivo, por ejemplo, un ratón es trasplantado con células de cáncer, se le administra el material candidato, y se confirma la proliferación de las células cancerosas trasplantadas. Del mismo modo, el ensayo in vivo puede ser implementado para evaluar el efecto de supresión sobre la proliferación celular dependiente de estrógenos. En este caso, al ratón trasplantado con las células cancerosas se le administra estrógenos y el material candidato al mismo tiempo o secuencialmente, y se confirma la proliferación de las células cancerosas trasplantadas. Los métodos para tal ensayo in vitro y ensayo in vivo se ejemplifican en los ejemplos en la memoria descriptiva.

La expresión "confirmada para el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas" en el método de detección antes mencionado significa que la velocidad de proliferación de las células de cáncer se suprime en presencia de una sustancia de ensayo en al menos un 10% o más, preferiblemente 25% o más, más preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 75%, 80%, 85%, 90% o 95% o más, en comparación con la velocidad de proliferación detectada en ausencia de la sustancia de ensayo. Así, cuando la sustancia de ensayo inhibe la velocidad de proliferación de las células cancerígenas en por lo menos el 10% o más, la sustancia de ensayo se caracteriza como una sustancia "confirmada para el efecto de supresión de la proliferación de células cancerosas".

En lo sucesivo en este documento, la presente invención se describirá adicionalmente con detalle en referencia a los Ejemplos. Sin embargo, los materiales, los métodos, y los ejemplos descritos a continuación son sólo ejemplos de varios aspectos de la presente invención, y el alcance de la presente invención no se limita a ellos en absoluto. Por lo tanto, métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la memoria descriptiva pueden ser utilizados para la aplicación o la investigación de la presente invención.

Ejemplos

En lo sucesivo en este documento, la presente invención se describirá adicionalmente específicamente mediante Ejemplos. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no se limita a estos Ejemplos.

[Ejemplo 1] Efecto sobre el cáncer de mama dependiente de estrógenos

5 1. Materiales y métodos

Línea celular y muestra clínica

10 Las líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7, ZR-75-1, HCC1500, BT-474, YMB-1 y T47D) y COS-7 fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.). KPL-1 y KPL-3C fueron proporcionados por el Dr. Junichi Kurebayashi (Escuela de Medicina de Kawasaki, Okayama, Japón) bajo un acuerdo de transferencia de material. HBC4 y HBC5 fueron proporcionados por el Dr. Takao Yamori (Fundación Japonesa para la Investigación del Cáncer, Centro para la quimioterapia del cáncer, Departamento de Farmacología Molecular) bajo un acuerdo de transferencia de material. Todas las líneas celulares se cultivaron en las condiciones recomendadas por cada depositante.

Tratamiento de las células

15 Se suspendieron células MCF-7 en MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) reforzado con 10% de FBS (Nichirei Biosciences, Tokio, Japón), 1% de solución de antibiótico/antimicótica (Invitrogen), NEAA 0,1 mM (Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM y 10 µg/ml de insulina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). A continuación, la suspensión de células se sembró en una placa de 48 pocillos (2×10^4 células/200 µl), una placa de 24 pocillos (1×10^5 células/1 ml), una placa de 6 pocillos (5×10^5 células/2 ml) o placa de 10 cm (2×10^6 células/10 ml). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera humidificada que contenía 5% de dióxido de carbono. Al día siguiente de la siembra, el medio de cultivo se cambió con rojo de fenol libre de DMEM/F12 (Invitrogen) reforzado con FBS, una solución antibiótica/antimicótica, NEAA, piruvato de sodio e insulina. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con 17β estradiol 10 nM (E2, Sigma). Se añadió el péptido ERAP-1 justo antes de la estimulación de E2 en la prueba de inhibición.

25 Análisis de transferencia Western

Las células se lisaron con tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM: pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,1% NP-40, y 0,5% de CHAPS) que contiene 0,1% de cóctel inhibidor de proteasa III (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.). El lisado celular se sometió a electroforesis, se transfirió sobre una membrana de nitrocelulosa, y se bloqueó con una solución 4% BlockAce (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japón) durante 1 hora. La membrana se incubó en presencia de los anticuerpos descritos a continuación durante 1 hora:

Anticuerpo anti-ERAP1 (Kim JW, et al. Cancer Sci. 2009; 100: 1468-1478);

Anticuerpo anti-PHB2 (Abcam, Cambridge, Reino Unido);

Anticuerpo anti-NCoR (Abcam, Cambridge, Reino Unido);

Anticuerpo REα anti-fosforilación (Tyr537) (Abcam, Cambridge, Reino Unido);

35 Anticuerpo anti-REα (AER314) (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-SRC-1 (128E7) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-Shc (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpos anti-α/β-tubulina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-Akt (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

40 Anticuerpo anti-fosforilación de Akt (Ser473) (587F11) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-p44/42 MAP quinasa (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-fosforilación de p44/42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-fosforilación REα (Ser104/106) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

45 Anticuerpos Anti-HDAC1 (H-11) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-IGF-1Rβ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

Anticuerpo p85 α anti-PI3-quinasa (U13) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-Ub (P4D1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-lamina B1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

Anticuerpo RE α anti-fosforilación (Ser118) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

5 Anticuerpo RE α anti-fosforilación (Ser167) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

Anticuerpo RE α anti-fosforilación (Ser305) (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.);

Anticuerpo Anti- β -actina (AC-15) (Sigma);

Anticuerpo anti-FLAG-tag M2 (Sigma);

Anticuerpo anti-HA-tag (Roche, Mannheim, Alemania); o

10 Anticuerpo anti-fosforilación tirosina (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.).

A continuación, la membrana se incubó en presencia de anticuerpo secundario unido a HRP (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora. A continuación, la membrana se desarrolló con el sistema de quimioluminiscencia potenciado (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). La transferencia fue escaneada utilizando un lector de imágenes LAS-3000 mini (Fujifim, Tokio, Japón).

15 Inmunoprecipitación

Como se describe en el punto "Análisis de transferencia Western", las células se lisaron con un tampón de lisis NP-40 al 0,1%. El lisado celular se sometió a una limpieza previa utilizando IgG normal y rec-proteína G Sepharose 4B (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.) a 4°C durante 3 horas. Después de la separación por centrifugación, el sobrenadante se incubó en presencia de un anticuerpo anti-ERAP1, un anticuerpo anti-PHB2 y un anticuerpo anti-RE α a 4°C durante 6 horas. Entonces, el sobrenadante se incubó en presencia de rec-Protein G Sepharose 4B a 4°C durante 1 hora, para precipitar un complejo antígeno-anticuerpo. El complejo de la proteína inmunoprecipitada se lavó con tampón de lisis tres veces, y se separó por SDS-PAGE. Entonces, el análisis de Western Blot se realizó por el método descrito previamente (Kim JW, et al. Cancer Sci. 2009;100: 1468-1478).

20

Identificación de la región de unión de PHB-2 de la proteína ERAP1

25 Con el fin de determinar la región de unión de PHB2 en ERAP1, cinco constructos diferentes correspondientes a los péptidos parciales (ERAP1₁₋₄₃₄, ERAP1₄₃₅₋₂₁₇₇, ERAP1₁₄₆₈₋₂₁₇₇, ERAP1₁₋₂₅₀, ERAP1₁₋₁₀₀) de la proteína ERAP1 se clonaron en los sitios apropiados de un vector pCAGGS marcado con Flag N-terminal. Células COS-7 se transfectaron con cada plásmido de FLAG-ERAP1 y HA-PHB2 utilizando el reactivo de transfección FuGENE6 (Roche). Después de 48 horas de la transfección, las células se lisaron con tampón de lisis NP-40 0,1% como se describió anteriormente. El lisado celular se sometió a limpieza previa a 4°C durante 3 horas, y luego el lisado celular se incubó a 4°C durante 6 horas en presencia de agarosa anti-Flag M2 (Sigma). Entonces, la proteína inmunoprecipitada o el lisado celular se sometió a electroforesis, y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó en presencia del anticuerpo M2 anti-FLAG-tag o el anticuerpo anti-HA-tag.

30

Efecto negativo dominante de la variante ERAP1 suprimida (1-434) en la unión de ERAP1 y REA

35 La influencia de la variante ERAP1-suprimida (1-434) en la interacción entre ERAP1 y PHB2, y la influencia de la estimulación de E2 sobre la actividad de ERE se investigaron usando un constructo del vector de expresión (ERAP1₁₋₄₃₄) que consiste en los residuos de aminoácidos 1-434 de ERAP1 (SEQ ID NO: 33), que se estiman que son importantes para la interacción entre ERAP1 y PHB2. En el ensayo de inhibición de unión, células COS-7 fueron transfectadas con Flag-ERAP1 junto con HA-PHB2 por el reactivo de transfección FuGENE6 (Roche). Después de 48 horas, las células se lisaron con un tampón de lisis NP-40 0,1%. El lisado celular se sometió a limpieza previa a 4°C durante 3 horas y, a continuación, el lisado celular se incubó a 4°C durante 6 horas en presencia de un anticuerpo anti-HA. Entonces, la proteína inmunoprecipitada o el lisado celular se sometió a electroforesis, y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó en presencia del anticuerpo M2 anti-FLAG-tag o el anticuerpo anti-HA-tag. Además, en la prueba de inhibición de la actividad de ERE, se transfectaron células COS-7 con ERAP1₁₋₄₃₄, ERAP1, PHB2, ER α , y cada plásmido de los vectores de ERE-luciferasa por el reactivo de transfección FuGENE6. Al mismo tiempo, las células se estimularon con E2 durante 48 horas. Las células se recogieron, y se evaluaron las actividades de luciferasa y Renilla luciferasa usando el ensayo de indicador de Luciferasa Promega Dual (Tokio, Japón). Todos los datos se estandarizaron por la actividad de Renilla luciferasa en consideración a la eficiencia de transfección.

50

Péptido negativo dominante

Al amino terminal del péptido que consiste en 13 aminoácidos derivados del dominio de unión de PHB2 de ERAP1 (codón 165-177: QMLSDLTLQLRQR (SEQ ID NO: 27)), una secuencia de poliarginina (11R) que consiste en 11 argininas permeables membrana células fue unida covalentemente. El péptido ERAP1-codificado (DRQLQLSTLQRM (SEQ ID NO: 28)) y el péptido ERAP1-mutante (AMLSALTLALRQR (SEQ ID NO: 29)) fueron sintetizados como control. Con el fin de comprobar la influencia del péptido ERAP1 11R-unido sobre la inhibición de la formación del complejo ERAP1-PHB2, células MCF-7 fueron tratadas con 10 μ M del péptido ERAP1 en presencia de E2 10 nM. Después de 24 horas, las células se lisaron con un tampón de lisis NP-40 0,1%. Entonces, como se describe en el punto "Inmunoprecipitación", el lisado celular se incubó en presencia de un anticuerpo anti-ERAP1 y un anticuerpo anti-PHB2. Entonces, la proteína inmunoprecipitada o el lisado celular se sometió a electroforesis, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Por último, el análisis de transferencia de Western se realizó usando un anticuerpo anti-ERAP1 o un anticuerpo anti-PHB2, y se detectó la proteína ERAP1 o PHB2 inherente, respectivamente.

Tinción química de células inmunes

Células MCF-7 fueron sembradas en una cámara de 8 pocillos (Laboratory-Tek II Chamber Slide System, Nalgen Nunc International, Naperville, IL, EE.UU.) en 5×10^4 células/pocillo, y se cultivaron en condiciones libres de estrógenos durante 24 horas. Después de las 24 horas de la exposición a E2 y/o al péptido ERAP1, se trataron las células con paraformaldehído al 4% a 4°C durante 30 minutos para fijar las células, y se trataron con 0,1% Triton X-100 durante 2 minutos por medio de lo cual se hacen las células permeables. Entonces, las células se recubrieron con 3% de BSA para bloquear la hibridación no específica. Después, las células se incubaron adicionalmente durante 1 hora en presencia de un anticuerpo anti-PHB2. Las células se lavaron con PBS, y después se incubaron en presencia de anticuerpo anti-conejo de unión de Alexa 594 (Molecular Probe, Eugene, OR, EE.UU.) durante 1 hora por medio del cual se tiñeron las células. El núcleo se contra-tiñó con dihidrocloruro de 4,6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI, Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). La imagen de la fluorescencia se obtuvo bajo un microscopio Olympus IX71 (Tokio, Japón).

Fraccionamiento del núcleo/citoplasma

Con el fin de evaluar la localización de PHB2, se trataron células MCF-7 tal como se describe anteriormente. Entonces, la inmunoprecipitación se realizó utilizando un anticuerpo anti-ERAP1, un anticuerpo anti-PHB y un anticuerpo anti-RE α en presencia de rec-proteína G Sepharose utilizando los extractos del núcleo y el citoplasma de las células MCF7. Los extractos del núcleo y del citoplasma se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando el reactivo de extracción nuclear y citoplásmico NE-PER (Thermo Fisher Scientific). El contenido de proteína de las fracciones de citoplasma y nucleares fueron evaluados con tinción con azul brillante de Coomassie.

Ensayo indicador de luciferasa

Para el ensayo indicador de ERE, fueron transfectadas células MCF-7 con el indicador de ERE (SABiosciences, Frederick, MD, EE.UU.), de conformidad con las instrucciones del fabricante. Para el ensayo indicador de AP-1, fueron transfectadas células MCF-7 con el indicador AP-1 (promotor IL-11 de ratón que comprende dos sitios en tándem AP-1 subclonados en el vector PGL2-básico), c-fos, c-Jun y PRL-TK como un estándar interno. Después de 16 horas de la transfección, el medio de cultivo se cambió con un medio de cultivo de ensayo (Opti-MEM, 10% FBS, NEAA 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM y 10 μ g/ml de insulina). Después de 24 horas de la transfección, las células fueron tratadas con E2 y/o el péptido ERAP1 durante 24 horas. Las células se recogieron, y se evaluaron las actividades de luciferasa y Renilla luciferasa usando el ensayo indicador de Luciferasa Promega Dual (Tokio, Japón). En consideración a la eficiencia de la transfección, todos los datos se estandarizaron según la actividad de Renilla luciferasa.

Ensayo de desacetilación

El ensayo HDAC se realizó utilizando el Kit ensayo de actividad fluorescente de HDAC/descubrimiento de fármaco (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, EE.UU.), de conformidad con las instrucciones del fabricante. Células MCF-7 fueron tratadas con E2 y/o el péptido(s) ERAP1 durante 24 horas en una placa de 6 pocillos. A continuación, el extracto de células se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-PHB2. Además, el extracto de células inmunoprecipitadas se incubó durante 30 minutos en presencia de un sustrato a 30°C. Después de la incubación, la reacción se detuvo, y la fluorescencia se analizó con un fluorómetro de microplaca (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Suiza).

PCR semi-cuantitativa de transcripción inversa

La baja regulación de RE α se evaluó por PCR semi-cuantitativa de transcripción inversa. ARN completo se extrajo utilizando el kit de purificación RNeasy Mini (Qiagen) a partir de células tratadas con E2 en presencia o en ausencia del péptido ERAP1, y se sometió a transcripción inversa en ADNc usando transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), cebador oligo dT (Invitrogen) y 25 mM de mezcla dNTP (Invitrogen). Los ARNm de RE α y β -actina se

midieron con el sistema PCR GeneAmp (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Los cebadores son como se describen a continuación:

ER α : 5'-GCAGGGAGAGGAGTTTGTGTG-3' (SEQ ID NO: 1) y

5'-TGGGAGAGGATGAGGAGGAG-3' (SEQ ID NO: 2);

5 β -actina: 5'-GAGGTGATAGCATTGCTTTCG-3' (SEQ ID NO: 3) y

5'-CAAGTCAGTGACAGGTAAGC-3' (SEQ ID NO: 4).

PCR a tiempo real

10 Las expresiones de los genes diana de RE α (pS2, ciclina D1, c-myc, SP-1, E2F1 y PGR), ERAP1 y PHB2 fueron evaluadas con PCR a tiempo real. Además, la cantidad de expresión de PHB2 no informado como diana de RE α también se midió como control negativo. β 2-MG se utilizó como control estándar interno. Se realizaron la extracción del ARN completo y la siguiente síntesis de ADNc como se describió anteriormente. El ADNc se analizó con PCR a tiempo real en 500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SYBR (marca registrada) Premezcla Ex Taq (Takara Bio, Shiga, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra se estandarizó con el contenido de ARNm de β 2-MG. Los cebadores usados para la amplificación son como se describen a continuación:

15 pS2: 5'-GGCCTCCTTAGGCAAATGTT-3' (SEQ ID NO: 5) y

5'-CCTCCTCTCTGCTCCAAAGG-3' (SEQ ID NO: 6);

ciclina D1: 5'-CAGAAGTGCAGGAGGAGGT-3' (SEQ ID NO: 7) y

5'-CGGATGGAGTTGTCTGGTGT-3' (SEQ ID NO: 8);

c-myc: 5'-CGTCTCCACACATCAGCACA-3' (SEQ ID NO: 9) y

20 5'-GCTCCGTTTTAGCTCGTTCC-3' (SEQ ID NO: 10);

SP-1: 5'-TGCTGCTCAACTCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 11) y

5'-GCATCTGGGCTGTTTTCTCC-3' (SEQ ID NO: 12);

E2F1: 5'-TACCCCAACTCCCTCTACCC-3' (SEQ ID NO: 13) y

5'-CCCACTCACCTCTCCCATCT-3' (SEQ ID NO: 14);

25 RPg: 5'-CCCCGAGTTAGGAGACGAGA-3' (SEQ ID NO: 15) y

5'-GCAGAGGGAGGAGAAAGTGG-3' (SEQ ID NO: 16);

ERAP1: 5'-CTTGACAAGGCCTTTGGAGT-3' (SEQ ID NO: 17) y

5'-CAATATGCTTTTCCCGCTTT-3' (SEQ ID NO: 18);

PHB2: 5'-GGATCTGCTTCTCCAGTTTT-3' (SEQ ID NO: 19) y

30 5'-ACTGAGAAATCACGCACTGT-3' (SEQ ID NO: 20);

β 2-MG: 5'-AACTTAGAGGTGGGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 21) y

5'-CACAACCATGCCTTACTTTATC-3' (SEQ ID NO: 22).

Ensayo de proliferación celular

35 Usando el recuento celular Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japón), se realizó el ensayo de proliferación celular. Se recogieron las células y se sembraron en 2×10^4 células/pocillo en una placa de 48 pocillos, y se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificado. En los puntos de tiempo indicados, se añadieron las células con una solución de CCK-8 diluida a 1:10, y se incubaron durante 1 hora. A continuación, se midió la absorbancia a 450 nm y se calculó el número de células vivas en cada pocillo.

Ciclo celular

40 Las células se fijaron con etanol frío al 70%, y se tiñeron con 20 μ g/ml de yoduro de propidio (Sigma) y 1 mg/ml de ribonucleasa A (Sigma), y se analizaron con FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). El ciclo celular se evaluó utilizando el software CellQuest (BD).

Inhibición de la proliferación tumoral in vivo

La suspensión de células KPL-3C (1×10^7 células/ratón) se mezcló con la misma cantidad de Matrigel (BD). Esta mezcla se inyectó en el cuerpo de la grasa de la mama de ratones hembra desnudos BALB/c de 6 semanas de edad (CLEA Japan, Tokyo, Japón). Los ratones se mantuvieron en una instalación aislada estéril con un ciclo de luz de 12 horas/oscuridad 12 horas, y se alimentaron libremente con comida para roedores y agua. El tumor se hizo crecer durante 1 semana hasta que el tamaño del mismo alcanzó de 50 a 80 mm³ (calculado como $1/2 \times (\text{anchura} \times \text{longitud}^2)$). Entonces, los ratones se dividieron aleatoriamente en nueve grupos de tratamiento (5 individuos/grupo): grupo sin tratamiento, 6 µg/día grupo de tratamiento E2, E2 + 0,28 mg/día grupo de tratamiento péptido ERAP1, E2 + 0,7 mg/día grupo de tratamiento péptido ERAP1, E2 + 1,4 mg/día grupo de tratamiento péptido ERAP1, E2 + 0,28 mg/día grupo de tratamiento péptido codificado, E2 + 0,7 mg/día grupo de tratamiento péptido codificado, E2 + 1,4 mg/día grupo de tratamiento péptido codificado, y E2 + 83 µg/día grupo de tratamiento con tamoxifeno. Los ratones fueron tratados todos los días con 6 µg/día de solución E2 ($100 \mu\text{l}$ $2,2 \times 10^{-4}$ M) en la piel del cuello. El péptido ERAP1 o el péptido codificado se administraron a los ratones a 0,28, 0,7, o 1,4 mg/día (14, 35, 70 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal cada día. El tamoxifeno también se administró por vía intraperitoneal a los ratones en una dosis de 4 mg/kg, cada día. El volumen del tumor se midió durante 2 semanas usando calibradores. Cuando se completó la prueba, el animal fue sacrificado, y además el tumor fue retirado para realizar el análisis de la expresión del gen diana ER α , y congelado con nitrógeno líquido. Los datos in vivo se indicaron como el valor medio del volumen del tumor $\pm$ el error estándar del valor medio. El valor de p cuando se completó la prueba, se calculó mediante la prueba t de Student. Todas las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del animalario de la Universidad de Tokushima.

Ensayo del chip

El ensayo del chip se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante usando EZ-chip (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Células MCF-7 fueron tratadas con E2 y/o el péptido ERAP1 durante 24 horas. A continuación, las células se fijaron con formaldehído al 37%, se resuspendieron en un tampón de lisis, y se trituraron con ondas ultrasónicas en 10 segundos $\times$ 10 con Microson XL-2000 (Misonix, Farmingdale, NY, EE.UU.). El sobrenadante se preacclaró con perlas de proteína G agarosa, y se recogió la entrada al 1%. La inmunoprecipitación (por cada 1×10^6 células) se realizó (durante la noche, 4°C) utilizando un anticuerpo anti-ER α , un anticuerpo anti-PHB2, un anticuerpo anti-HDAC1 un anticuerpo anti-NCoR, y un anticuerpo anti-SRC-1, y la IgG normal de ratón como control. El complejo ADN-proteína fue retirado hacia abajo con perlas de proteína G de agarosa (1 hora, 4°C) y se lavó. El inmunoprecipitado se volvió a suspender en tampón de elución. A continuación, la suspensión obtenida se incubó a 65°C durante 5 horas con el fin de liberar la reticulación. Entonces, el inmunoprecipitado se purificó usando la columna accesoria de purificación. El fragmento de ADN se detectó con 25 a 28 ciclos de PCR. Como los cebadores para la región ERE del genoma ERAP1, fueron usados:

5'-GGGGTACCTTATATCACTAGTCGACA-3' (SEQ ID NO: 23) y

5'-CCGCTCGAGAGAACTAGAGCAGACAA-3' (SEQ ID NO: 24).

Análisis estadístico

Para determinar la significación estadística de la diferencia entre los grupos de ensayo, se utilizó la prueba t de Student. El valor de p < 0,05 fue considerado como significativo.

Estimación del sitio de interacción

El sitio de interacción de ERAP1 y PHB2 se estimó mediante PSIVER. El PSIVER (predicción de sitios de interacción proteína-proteína Server) es un método de cálculo para la estimación de los residuos que se unen a otras proteínas usando sólo las características de la secuencia (matriz de puntuación específica del sitio y el área superficial de contacto con el disolvente estimada). Para el método de cálculo, se utiliza el clasificador Naive Bayes provisto con la densidad kernel deducida, y el servidor de estimación se abre a Internet. Se utilizó 0,390, que era el umbral predeterminado, en la presente invención.

Proteína recombinante PHB2

La secuencia parcial de PHB2 humana (residuos 77-244) se clonó en los sitios NcoI y XhoI del vector de expresión pTAT6 (véase, obsequio del Dr. Marko Hyvonen, Universidad de Cambridge: Peranen J, et al., (1996). Anal Biochem. 236,371-373.) con el fin de convertirse en el armazón interno con el marcador de hexahistidina, la tiorredoxina (TrxA) y sitio de proteasa corte TEV (sitio de TEV) en el terminal amino. La proteína recombinante se expresó en la línea celular BL21 star de Escherichia coli (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se purificó utilizando el Kit Hi-Trap (GE Healthcare). Por último, la proteína recombinante se purificó de acuerdo con el protocolo del proveedor usando la columna de filtración en gel Superdex 200 (GE Healthcare) con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2. Resultados

Identificación de la inhibición del péptido de la unión de ERAP1-PHB2/REA

Los presentes inventores llevaron a cabo los experimentos descritos a continuación con el fin de desarrollar un inhibidor dirigido de la interacción de ERAP1 y PHB2/REA. En primer lugar, se intentó determinar la región de unión en ERAP1 a PHB2/REA. Tres construcciones de vectores de expresión (ERAP1₁₋₄₃₄: aminoácidos 1-434, ERAP1₄₃₅₋₂₁₇₇: aminoácidos 435-2177, y ERAP1₁₄₆₈₋₂₁₇₇: aminoácidos 1468-2177) se fabricaron (Fig. 1A) de manera que se cubriera la longitud completa de la proteína ERAP1, y la región de unión se examinó con el método de transferencia de Western usando la inmunoprecipitación de estos. Como consecuencia, la unión específica con PHB2/REA a través de la región de los residuos de aminoácidos 1-434 de ERAP1 se confirmó (Fig. 1B). La posterior refinación de la región de unión realizada en ERAP1₁₋₄₃₄ confirmó esta unión con PHB2/REA. Las construcciones del vector de expresión (ERAP1₁₋₂₅₀: aminoácidos 1-250, y ERAP1₁₋₁₀₀: aminoácidos 1-100) se fabricaron después (Fig. 1C), y usando estas, la región de unión se examinó de manera similar con el método de transferencia Western-inmunoprecipitación. Como consecuencia, la unión específica con PHB2/REA fue confirmada a través de la región de los residuos de aminoácidos 101-250 de ERAP1 (Fig. 1D).

A continuación, con el fin de verificar estos resultados, fueron examinadas las influencias del constructo del vector de expresión ERAP1₁₋₄₃₄ (aminoácidos 1-434) en la unión de la actividad transcripcional de ERAP1-PHB2 y ERE de RE α . Células COS-7 fueron transfectadas con un constructo de la variante ERAP1- deleciónado (Δ ERAP1: ERAP1₁₋₄₃₄) en las concentraciones mostradas en la Fig. 1E, junto con Flag-de cadena completa-ERAP1 y un constructo HA-PHB2. Las células se lisaron después de 48 horas de la transfección. Entonces, PHB2 marcado con HA se inmunoprecipitó a partir del lisado de células con el anticuerpo anti-HA. Como consecuencia, la unión a ERAP1 y PHB2/REA se inhibió dependiendo de la dosis del constructo de la variante introducida ERAP1-deleciónado (Δ ERAP1: ERAP1₁₋₄₃₄) (Fig. 1E). Además, se reconoció también que la actividad transcripcional de ERE de RE α fue suprimida por la introducción del constructo variante ERAP1-deleciónado (Δ ERAP1: ERAP1₁₋₄₃₄) (fig. 1F).

Con el fin de determinar más detallada la unión de la secuencia de aminoácidos, el sitio estimado para la interacción de ERAP1 se examinó utilizando sistema de estimación de interacción proteína-proteína PSIVER (5), que fue desarrollado por Mizuguchi et al. del Instituto Nacional de Innovación Biomédica. Como consecuencia, los aminoácidos 157-173 se estimaron como la región más prometedora. Además, entre ellos, la glutamina en la posición 165 (Q), el ácido aspártico en la posición 169 (D) y la glutamina en la posición 173 mostraron la mayor puntuación como los residuos de aminoácidos estimados para la interacción (Fig. 1G). Además, a partir de la estructura estérica estimada de la región, se encontró que estos 3 residuos de aminoácidos estaban presentes en la estructura α hélice, y su cadena lateral fue expuesta a la superficie de la proteína en la misma dirección (Fig. 1H). Sobre la base de esta estimación, fue fabricado un constructo del vector de expresión (mutante ERAP1) en el que estos 3 residuos de aminoácido se sustituyeron con alanina (A), y la unión a PHB2/REA fue examinada con el método de inmunoprecipitación-transferencia Western. Como consecuencia, se demostró que la unión a PHB2/REA se inhibía de forma espectacular mediante la sustitución de estos 3 residuos de aminoácido (Fig. 1I).

Los presentes inventores consideraron que la región en la proximidad de estos 3 residuos de aminoácido de ERAP1 es importante para la interacción entre PHB2/REA, y se concentraron en 13 residuos de aminoácidos (residuos de aminoácidos 165-177: QMLSDLTLQLRQR (SEQ ID NO: 27)) de la estructura α hélice que comprende estos 3 residuos de aminoácido. Entonces, los presentes inventores sintetizaron el péptido negativo dominante (el péptido ERAP1) en el que se añadieron 11 residuos de arginina que tienen función transcelular al extremo N-terminal de los 13 residuos de aminoácidos. Además, los presentes inventores también sintetizaron un péptido en el que 13 secuencias de residuos de aminoácidos se clasificaron aleatoriamente (el péptido ERAP1-codificado: DRQLQLSTLQRML (SEQ ID NO: 28)) como control, y un péptido en el que los 3 residuos de aminoácido importantes para la unión fueron todos sustituidos con alanina (el péptido ERAP1-mutante: AMLSALTALRQR (SEQ ID NO: 29)), respectivamente (Fig. 1J). Usando estos péptidos, la inhibición de la unión de ERAP1 y PHB2/REA se investigó con el método de inmunoprecipitación-transferencia Western usando un anticuerpo anti-ERAP1 y un anticuerpo anti- PHB2/REA. Se encontró que cuando se añadía el péptido ERAP1 a MCF-7 (Fig. 1K, el panel superior) y KPL-3C (Fig. 1K, el panel inferior), que son células de cáncer de mama ER-positivas, la unión de ERAP1 inherente y PHB2/REA inherente fue notablemente inhibida. Por otro lado, cuando se añadía el péptido ERAP1-codificado o el péptido ERAP1-mutante, la inhibición de la unión de ERAP1 inherente y PHB2/REA inherente no fue reconocida en ninguna de las células (Fig. 1K).

A continuación, se examinó si el péptido ERAP1 inhibía directamente la unión de la proteína ERAP1-PHB2/REA. La proteína recombinante PHB2/REA (6xHis-PHB2/REA) a la que se añadió histidina marcada (His) preparada en un sistema de expresión para Escherichia coli, se mezcló con el lisado celular de las células COS7 después de la expresión forzada de ERAP1 (Flag-ERAP1). A esta mezcla, se añadió el péptido añadido con HA marcado (ERAP1-HA-péptido) a cada concentración. Entonces, la inhibición de la unión se examinó con resina Ni desplegable y el método Western. Como consecuencia, ERAP1-HA-péptido directamente ligado a His-PHB2/REA, dependiendo de la concentración. Como consecuencia, se encontró que la unión de Flag-ERAP1 y His-PHB2/REA fue inhibida competitivamente (Fig. 2). Como se describió anteriormente, se encontró que el péptido ERAP inhibe directamente la unión de ERAP1 y PHB2/REA, específicamente a la secuencia.

Influencia de péptido ERAP1 en la activación transcripcional de RE α

Se ha mostrado hasta ahora que PHB2/REA tenía una función de supresión de la actividad transcripcional de RE con la translocación nuclear del citoplasma (Montano MM, et al, Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 6947-52); al ser localizado en la membrana de las mitocondrias y tener una función de mantenimiento de la forma de la mitocondria y bio-síntesis de la mitocondria y la regulación de la apoptosis (Kasashima K, et al., J Biol Chem. 2006; 281: 36401-10; Artal Sanz-M y N. Tavernarakis Trends Endocrinol Metab. 2009;20: 394-401); y estar relacionada con la regulación de la cohesinas de cromátidas hermanas (Artal Sanz-M y Tavernarakis N. Trends Endocrinol Metab. 2009; 20: 394-401; Tanaka H, et al., Current Biology. 2007; 17: 1356-1361), y se considera como una proteína multifuncional. Por lo tanto, su localización intracelular todavía está en discusión. Como se describió anteriormente, se investigaron la localización de PHB2/REA inherente en células de cáncer de mama, y el cambio de la localización de PHB2/REA por la estimulación de E2 o la administración del péptido ERAP1. Las fracciones de las mitocondrias, el citoplasma y el núcleo de las células de cáncer de mama MCF-7 en cada condición de tratamiento de E2, sin tratamiento o tratamiento con péptido ERAP1, se recogieron, respectivamente, y la localización de PHB2/REA inherente se examinó con el método Western. Como consecuencia, la localización de PHB2/REA inherente fue reconocida en ambos el citoplasma y las mitocondrias, y el cambio de la localización no fue reconocido incluso después del tratamiento de E2. Por otro lado, cuando E2 y el péptido ERAP1 se administraron al mismo tiempo, se reconoció una notable translocación de PHB2/REA desde el citoplasma al núcleo. Además, una cierta disminución de la cantidad de proteína de PHB2/REA en la mitocondria se reconoció con la adición del péptido ERAP1 en forma dependiente de E2, y se sugirió la translocación de PHB2/REA de la mitocondria en el citoplasma o el núcleo (figura 3A).

A continuación, se investigó temporalmente la translocación de PHB2/REA desde el citoplasma al núcleo por el péptido ERAP1. La translocación nuclear oportuna del PHB2/REA inherente en 1 hora después de la administración del péptido ERAP1 a las células MCF-7 fue reconocida, y la translocación aumentó temporalmente hasta 24 horas (Figs. 4A y 4B). Por otro lado, la translocación nuclear de PHB2/REA no fue reconocida con el péptido ERAP1-codificado (Figs. 4A y 4B). Además, el péptido ERAP1 al que se añadió el marcador HA (ERAP1-HA-péptido) se sintetizó con el fin de investigar el comportamiento del péptido ERAP1, y el comportamiento se examinó utilizando el péptido. Por lo tanto, se reconoció que ERAP1-HA-péptido se unía directamente a PHB2/REA y era translocado al núcleo al mismo tiempo (Figs. 3B y 3C).

Posteriormente, la influencia de la administración del péptido ERAP1 sobre la actividad transcripcional de RE α se investigó con el ensayo indicador de ERE (elemento responsable de estrógeno) y la secuencia de unión de AP-1 utilizando células MCF-7. Como consecuencia, se confirmó que el péptido ERAP1 (o ERAP1-HA-péptido) suprime la actividad transcripcional de RE α en ERE (Fig. 4C, y figuras 3D y 3E) y AP-1 (Fig. 4D y Fig. 3F), dependiendo respectivamente de la concentración. Sin embargo, ningún cambio se reconoció en las células añadidas con el péptido ERAP-codificado o el péptido ERAP-mutante (Figs. 3E y 3F). Además, la supresión de la actividad transcripcional de ERE-ER α se reconoció de manera similar por la administración del péptido ERAP1 también en KPL-3C, que es otra línea de células positiva para ER (Fig. 3G). A partir de éstas, se encontró que el péptido ERAP1 llevaba a la translocación nuclear dependiente de E2 de PHB2/REA, y como consecuencia, suprimía tanto las activaciones transcripcionales clásicas (ERE) como no clásicas (AP-1) de RE α .

Se ha demostrado hasta el momento que PHB2/REA suprime la transcripción de RE α al ser trasladado en el núcleo y unido a ER, formando un complejo con un factor de supresión de acoplamiento de la transcripción NCoR; e interaccionando con una enzima de desacetilación de histonas HDAC1 (Hurtev V, et. al., J Biol Chem. 2004; 279: 24834-43). De lo descrito anteriormente, la influencia de la administración del péptido ERAP1 en la interacción entre RE α y estos factores de supresión de la transcripción se investigó usando células MCF-7, que son células positivas para ER. Se ha reconocido hasta el momento que cuando se administraba E2, el RE α se unía a un activador transcripcional SRC-1 (Tai H, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2000; 267: 311-6). Por otra parte, se encontró que cuando se administraba el péptido ERAP1, la unión de RE α y SRC-1 disminuía, mientras que RE interactuaba con PHB2/REA, y se reclutaba más NCoR y HDAC1 para formar un complejo (Fig. 4E). De manera similar, se encontró también en las células KPL-3C que cuando se administraba el péptido ERAP1, RE α reclutaba NCoR y HDAC1 para formar un complejo (Fig. 3H). Además, se reconoció que cuando se administraba el péptido ERAP1, la actividad de HDAC1 se aceleraba de forma dependiente de la dosis (Fig. 4F), lo que sugiere que RE reclutaba a estos factores para formar un complejo, por el que causaba la desacetilación de histonas y como consecuencia, aglutinaba la cromatina y suprimía la actividad transcripcional de RE.

Influencia del péptido ERAP1 en el mecanismo de descomposición de ER α

Se ha publicado en los últimos años que la des-regulación de RE α dependiente de estrógenos es esencial para la activación transcripcional de RE α (Nawaz Z, et al, Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 1858-1862; Lonard DM, et al., Mol Cell. 2000; 5: 939-48; Reid G, et al., Mol Cell. 2003; 11: 695-707; Tateishi Y, et al, EMBO J. 2004; 23: 4813-23). Se sabe que esto es debido a la descomposición del RE α por el sistema de ubiquitina-proteasoma, y por lo tanto es importante el mecanismo de regulación en el ciclo de la unión y la disociación en el elemento responsable de estrógenos (ERE) de RE α después de la activación de la transcripción (Tai H, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2000; 267: 311-6; Nawaz Z, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 1858-1862; Lonard DM, et al., Mol Cell. 2000; 5: 939-48; Reid G, et al., Mol Cell. 2003; 11: 695-707). Por consiguiente, se examinó la influencia del sistema de

ubiquitina-proteasoma del péptido ERAP1 en el mecanismo de descomposición de $RE\alpha$. Como se ha publicado ya, cuando se administraban estrógenos a células MCF-7, la disminución en el nivel de proteína de $RE\alpha$ era reconocida después de 1 a 3 horas.

Por otra parte, se encontró que cuando se administraba el péptido ERAP1, la disminución del mismo se suprimía (Fig. 4G). A continuación, se investigó la poliubiquitinación de $RE\alpha$. Células MCF-7 fueron tratadas con E2 en presencia del inhibidor de proteasoma de 26S MG132. Como consecuencia, la disminución de proteínas de $RE\alpha$ fue suprimida y se reconoció la poliubiquitinación de $RE\alpha$. Sin embargo, cuando se administraba el péptido ERAP1, la poliubiquitinación de $RE\alpha$ era inhibida a pesar de la presencia de MG132, y la disminución de RE también se inhibía (Fig. 4H). También en las células KPL-3C (positivas para $ER\alpha$), la supresión de la disminución de proteínas de $RE\alpha$ se reconocía de manera similar con la inhibición de la poliubiquitinación por la administración del péptido ERAP1 en presencia de MG132 (Fig. 5). Como se describió anteriormente, se sugirió que PHB2/REA se disociaba de ERAP1 por la administración del péptido ERAP1 y que rápidamente era translocado al núcleo, y unido directamente a $ER\alpha$, por lo que se inhibía la poliubiquitinación de $RE\alpha$ y se suprimía el ciclo de la unión y la disociación de $RE\alpha$ en el elemento responsable de estrógeno (ERE), y finalmente conduciendo a la supresión para la activación transcripcional. Esto podría ser debido al hecho de que PHB2/REA se une a los residuos de lisina en las posiciones 302 y 304, que se ha demostrado como el sitio de la ubiquitinación de $RE\alpha$ (Berry NB, et al., Mol Endocrinology. 2008; 22: 1535-1551), por lo que causa la supresión de la poliubiquitinación en estos residuos de lisina.

Influencia del péptido ERAP1 sobre la proliferación celular

La influencia del péptido ERAP1 sobre la proliferación celular se investigó usando células MCF7 positivas para ambos $RE\alpha$ y ERAP1. Se reconoció que la administración del péptido ERAP1 dependiente de la dosis suprimía la proliferación celular dependiente de E2 hasta 24 horas (Fig. 6A). Por otro lado, la administración del péptido ERAP1-codificado o el péptido ERAP1-mutante no fue reconocido que proporcionaba el efecto de supresión de la proliferación celular (Fig. 6B). Además, el IC50 del efecto de supresión para la proliferación celular en células MCF-7 durante 24 horas fue 2,18 nM. Se obtuvieron resultados similares también en las células KPL-3C (Fig. 7A). Además, a partir de los ensayos en los que se administró el péptido ERAP1 durante cuatro días sucesivamente cada 24 horas, se encontró que la proliferación de las células de cáncer de mama dependientes de E2 era completamente suprimida con el péptido ERAP1 a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M (Figura 7B). Sin embargo, el péptido ERAP1 no tuvo ninguna influencia sobre la proliferación celular en absoluto en las células MCF-10A, que eran líneas de células epiteliales normales negativas para ambos $RE\alpha$ y ERAP1 (Fig. 6C). Posteriormente, con respecto a 7 clases de otras líneas celulares de cáncer de mama positivas para ambos $RE\alpha$ y ERAP1 (ZR-75-1, HCC1500, BT474, YMB-1, Y47D, KPL-1, HBC4), la influencia del péptido ERAP1 10 μ M en la proliferación de las células se examinó de manera similar. Por lo tanto, el péptido ERAP1 mostró un notable efecto de supresión de la proliferación dependiente de E2 en todas las células (Fig. 7C).

A continuación, se investigó la estabilidad del péptido ERAP1. El efecto de la supresión de la proliferación de células del péptido ERAP1 en células MCF-7 se midió temporalmente. Como consecuencia, un efecto de supresión completo de la proliferación dependiente de E2 fue reconocido hasta en 24 horas (Fig. 7D, panel izquierdo). Sin embargo, se encontró que la proliferación celular se recuperó aproximadamente 1,5 veces en 48 horas, y la actividad del indicador ERE- $RE\alpha$ también se recuperó (Fig. 7D, panel derecho). De lo descrito anteriormente, se encontró que el péptido ERAP1 suprimía continuamente la proliferación de las células de cáncer de mama dependientes de E2 hasta 24 horas.

Posteriormente, se examinó la influencia de la administración del péptido ERAP1 sobre el ciclo celular. E2 y 10 μ M del péptido ERAP1 o el inhibidor anti-E2 tamoxifeno (TAM) se administraron a las células MCF-7, al mismo tiempo, y se realizó el análisis FACS después de 24 horas. Como consecuencia, se observó la parada del ciclo celular en la fase G1 de la misma manera que con la administración de TAM 10 nM (Fig. 6D). Cuando se utilizó KPL-3C, fueron reconocidos resultados similares (Fig. 7E). De lo descrito anteriormente, se encontró que el péptido ERAP1 indujo la parada de la fase G1, con lo cual causó el efecto de supresión de la proliferación celular.

A continuación, fue investigada la influencia del péptido ERAP1 sobre la expresión de cada gen de PS2, ciclina D1, c-Myc, SP-1, E2F1, y PGR, que se publicó que estaba relacionado con la proliferación como un gen diana de $ER\alpha$. El péptido ERAP1 se añadió a células MCF-7, y la expresión de cada gen se examinó después de 24 horas con el método RT-PCR cuantitativa. Como consecuencia, se reconoció que la expresión de cualquiera de los genes se suprimía notablemente con la adición del péptido ERAP1 (Fig. 6E). Además, se examinó el efecto de supresión temporal para la expresión de estos genes diana. Como consecuencia, fue reconocido primero un significativo efecto de la supresión de la expresión por cualquiera de los genes 6 horas después de la adición del péptido (Fig. 8A). Además, se reconoció una notable supresión para la expresión de todos estos genes de manera similar también en línea de células de cáncer de mama positiva para $ER\alpha$ KPC-3C, con la adición del péptido ERAP1 (Fig. 8B). Como se describió anteriormente, se sugirió que el péptido ERAP1 suprimía la actividad transcripcional de $ER\alpha$, y, como consecuencia, suprimía la expresión del gen diana mediante el cual se inducía la supresión de la proliferación celular.

Influencia de péptido ERAP1 en la ruta de activación no genómica

Se sabe que RE α está localizado en la membrana celular (o directamente bajo la membrana celular), y se ha publicado que la llamada "ruta de activación de RE no genómica" en la que RE α interacciona con los receptores del factor de crecimiento de tipo membrana IGF-1R β (receptor del factor-1 de crecimiento tipo insulina β), HER2 y EGFR por la estimulación E2, activa rápidamente la cascada de señales celular y promueve la proliferación celular (Osborne CK, Schiff R. J Clin Oncol. 2005; 23: 1616-1622; Yager JD, Davidson NE. N Engl J Med. 2006; 354: 270-82; Johnston SR. Clin Cancer Res. 2010; 16: 1979-1987). Antiguos resultados muestran que la administración del péptido ERAP1 induce de manera notable la translocación nuclear de PHB2/REA, y como consecuencia, suprime la "ruta de activación genómica". Sin embargo, se pensaba que la mayoría de PHB2/REA se disociaba de ERAP1 y se translocaba en el núcleo después de la adición del péptido ERAP1, pero una parte del mismo unido al RE α de la membrana celular activado por estrógeno permanecía en el citoplasma como tal (Figs. 3A y 3B, y fig. 4B). De lo descrito anteriormente se examinó la influencia del péptido ERAP1 en la ruta de activación no genómica (ruta MAPK o AKT).

En primer lugar, se examinaron las influencias del péptido ERAP1 en la interacción de IGF-1R β y RE α a través de una molécula adaptadora publicada hasta el momento, es decir, la proteína Shc (Song RX, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101: 2076-81) y en la interacción de la proteína PI3K y RE α , respectivamente. Se ha reconocido que las células MCF-7 tienen expresiones de IGF-1R β y de la proteína PI3K (fig. 9A), y por lo tanto se añadieron estas células con el péptido ERAP1. Después de 24 horas, se extrajo la fracción del citoplasma que comprende la fracción de la membrana celular, y la inmunoprecipitación se llevó a cabo respectivamente con el anticuerpo anti-RE α . Como consecuencia, se encontró que cuando se administraba el péptido ERAP1, PHB2/REA unido a RE α , y se inhibía la unión de RE α y Shc y la unión de RE α y IGF-1R β , respectivamente, como consecuencia se suprimía la fosforilación de los residuos de tirosina de IGF-1R β y Shc, que es importante para la señal de la proliferación celular (Fig. 10A).

Además, se investigó la influencia del péptido ERAP1 en la interacción entre RE α y PI3K, que es otra ruta de activación no genómica dependiente de E2 a través del RE α tipo membrana. Se encontró que cuando se añadía el péptido ERAP1 a las células MCF-7, PHB2/REA unido a RE α , se inhibía la unión de RE α y PI3K (Fig. 10B). Posteriormente, las influencias sobre las fosforilaciones de Akt y MAPK, que son moléculas de señalización aguas abajo de IGF-1R β y PI3K, también se examinaron. Como consecuencia de ello, la fosforilación de Ser473 de Akt y la fosforilación de MAPK se inhibieron respectivamente a las 3 horas después de la adición del péptido ERAP1, y la supresión se mantuvo incluso después de 24 horas (Fig. 10C). Por otra parte, no fue reconocida la unión directa de PHB2/REA disociado de ERAP1 mediante la adición del péptido ERAP1 a cada uno de Akt y MAPK (Fig. 10B). De lo descrito anteriormente se encontró que el péptido ERAP1 disociado de PHB2/REA de ERAP1, y el PHB2/REA disociado inhibían directamente la unión dependiente de E2 de IGF-1R β y RE α y la unión de PI3K y ER, por lo que se inhibía su activación por la fosforilación, y como consecuencia, se suprimía la activación de las rutas de señal aguas abajo del mismo, es decir, las rutas Akt y MAPK. Se reconoció que la unión de RE α y Shc y la unión de RE α y IGF-1R β eran inhibidas (Fig. 9B) y las activaciones de AKT y MAPK se suprimieron también en células KPL-3C en las que las proteínas IGF-1R β y PI3K eran reconocidas que se expresaban (Fig. 9C).

Además, utilizando células de cáncer de mama positivas para RE α BT474, en las que fueron reconocidos que todos Her2, EGFR, IGF-1R β y PI3K se expresaban (Fig. 9A), se llevaron a cabo pruebas similares. Como consecuencia, se reconoció que todos los enlaces de RE α a Her2, EGFR, IGF-1R β y PI3K se inhibieron, respectivamente (Fig. 10D), y que las activaciones de las rutas de señal aguas abajo del mismo, es decir, las rutas Akt y MAPK, fueron suprimidas por el péptido ERAP1 (Fig. 10E). De los resultados anteriores se sugirió que el péptido ERAP1 disociado de PHB2/REA de ERAP1 y el RE α de la membrana celular unido directamente y PHB2/REA de manera dependiente de E2 inhibían la unión de RE α a IGF-1R β , HER2 o EGFR y suprimía la "ruta de actividad de la señal no genómica", y finalmente inducía la inhibición de la proliferación celular.

Influencia del péptido ERAP1 en la fosforilación de RE α

Se ha considerado en los últimos años que la modificación después de la traducción, en particular, la fosforilación de RE α es un factor regulador importante para varias rutas de señalización en la proliferación celular (Lannigan DA. Steroids. 2002; 68: 1-9; Barone I, et al., Clin Cancer Res. 2010; 16: 2702-08; Murphy LC, et al., Endocrine-Related Cancer. 2011; 18: R1-14). Se publicó que hasta el momento RE α es fosforilado en muchos sitios en forma dependiente de E2. Sin embargo, se sabe que la fosforilación de seis residuos de aminoácidos (Ser104, Ser106, Ser118, Ser167, Ser357 y Tyr537) es particularmente importante para la actividad transcripcional de RE α y la unión a E2 (Lannigan DA. Steroids. 2002; 68: 1-9; Barone I, et al., Clin Cancer Res. 2010; 16: 2702-08; Murphy LC, et al., Endocrine-Related Cancer. 2011; 18: R1-14). Por consiguiente, se examinó la influencia del péptido ERAP1 sobre la fosforilación de RE α después de la adición de E2 en células MCF-7. La potenciación de la fosforilación se confirmó en todos los seis sitios de RE α (Ser104, Ser106, Ser118, Ser167, Ser357 y Tyr537) de forma continua a partir de 3 horas a 24 horas después de la adición de E2, y cuando se administró el péptido ERAP1, las fosforilaciones en todos ellos fueron suprimidas en el mismo grado que con ninguna administración de E2 (Fig. 10F). Sin embargo, el efecto de supresión no fue reconocido con el péptido ERAP1-codificado (fig. 10F).

Como se describió anteriormente, se sugirió que PHB2/REA translocado en el núcleo por el péptido ERAP1 suprimía la fosforilación dependiente de E2 de RE α , con lo que se disminuía la capacidad de activación transcripcional de RE α y la capacidad de unión a E2, y por lo tanto se inactivaba RE α . Además, los presentes inventores llevaron a cabo experimentos similares también para otras células de cáncer de mama positivas para ER, es decir, las células KPL-3C (fig. 9D) y BT-474 (Fig. 9E). Como consecuencia, se encontró que también en estas células la fosforilación dependiente de E2 en todos los sitios fue suprimida por la administración del péptido ERAP1. Estos son los resultados obtenidos mediante la realización de experimentos por triplicado tres veces de forma independiente.

Investigación para el efecto antitumoral in vivo del péptido ERAP1

A continuación, se investigó el efecto antitumoral in vivo por el péptido ERAP1. Células de cáncer de mama positivas para ER KPL-3C se trasplantaron ortotópicamente a la glándula mamaria de ratones desnudos. Cuando el tumor alcanzó aproximadamente 70 mm³, se administró E2 por vía subcutánea y también se administraron por vía intraperitoneal el péptido ERAP1, el péptido ERAP1-codificado o tamoxifeno (TAM), respectivamente, y se examinó el efecto antitumoral. Como consecuencia, el efecto antitumoral se reconoció en el tumor del ratón al que el péptido ERAP1 se administró en el mismo grado que en el ratón sin administración de E2, y en el mismo grado que en el de la administración de TAM, en toda las dosis (Figs. 11A, 11B y 11C). Además, no fue reconocido cambio del peso corporal (Fig. 11D). Por el contrario, no fue reconocido ningún efecto significativo de la supresión del tumor en ninguna de las dosis en el ratón al que se administró el péptido ERAP1-codificado (Figs. 11B y 11C, y fig. 12).

A continuación, el estado de activación del gen diana de RE α se examinó en el tumor de un ratón al que se administró estos péptidos. Como consecuencia, las expresiones de los genes diana de RE α , es decir, PS2, ciclina D1, C-Myc y SP-1 fueron completamente suprimidas en el tumor al que se administró el péptido ERAP1, mientras que la supresión de la expresión no fue reconocida en el tumor al que se administró el péptido ERAP1-codificado (Fig. 11E). Además, la supresión de las fosforilaciones de las rutas de señal de activación no genómicas, es decir, Akt y MAPK, también se confirmó en el tumor al que se administró el péptido ERAP1 (Fig. 11F). Como se describió anteriormente, se sugirió que el péptido ERAP1 inhibía la unión de ERAP1 y PHB2/REA también in vivo como in vitro, inducía la unión de PHB2/REA y RE α , y, como consecuencia, suprimía las rutas de la "activación genómica" y la "activación no genómica" de RE α y, por lo tanto, exhibía un efecto antitumoral.

Aceleración de la expresión por el mecanismo de retroalimentación positivo de ERAP1

Los presentes inventores han encontrado hasta ahora que la expresión de ERAP1 se acelera por la estimulación de E2 (Kim JW, et al., Cancer Sci. 2009; 100: 1468-1478). A partir de esto, los presentes inventores construyeron una hipótesis de que ERAP1 era uno de los genes diana de ER α , y llevaron a cabo los experimentos descritos a continuación. La expresión de ERAP1 en el ARNm después de la administración de E2 en células MCF-7 se examinó con el método RT-PCR cuantitativa. Como consecuencia, se reconoció que la expresión se aceleraba en función del tiempo hasta 24 horas después de la administración de E2 (fig. 13A). Entonces, la expresión de ERAP1, cuando las células se trataban con un agente de tamoxifeno anti-E2 (TAM), se examinó también con el método de RT-PCR cuantitativa y el método Western. Como consecuencia, se reconoció que la expresión de ERAP1 era suprimida dependiendo de la concentración de TAM en ambos el nivel de ARNm y el nivel de proteína (Fig. 13B). Como se describió anteriormente, se encontró que ERAP1 recibía la regulación de la expresión dependiente de E2 en las células de cáncer de mama positivas para ER.

A continuación, se realizaron búsquedas con la estimación por ordenador si ERE (elemento responsable del estrógeno, secuencia sensible a E2: AGGTCAnnnTGACCT (SEQ ID NO: 25)) está presente en el gen ERAP1. Como consecuencia, la secuencia de ERE conservada de TCCAGTTGCATTGACCT (SEQ ID NO: 26) se confirmó en el intrón 1 de 5626 pb a 5644 pb aguas abajo del punto de iniciación de la transcripción (Fig. 13C). Las construcciones del vector de expresión que consisten en una región que comprende esta secuencia de ERE estimada (ERE en ERAP1), sólo la secuencia aguas arriba que no contiene la secuencia de ERE (ARRIBA) o sólo la secuencia aguas abajo que no contiene la secuencia de ERE (ABAJO) fueron fabricados, respectivamente, y se examinó la actividad del indicador de luciferasa. Como consecuencia, la aceleración de la actividad del indicador después de la estimulación E2 se confirmó sólo en las células a las que se introdujo una construcción que comprendía la secuencia de ERE en el gen ERAP1. Posteriormente, se examinó si RE α se unía o no directamente a esta secuencia de ERE estimada con el método de inmunoprecipitación de la cromatina (método ChIP) usando RE α y PHB2/REA y anticuerpos para HDAC1 y NCoR que se probaron que formaban un complejo con ellos. Como consecuencia, se reconoció que ERAP1 estaba unido a la secuencia de ADN con la adición del péptido ERAP1 en cualquier inmunoprecipitado usando los anticuerpos para cualquiera de las proteínas (Fig. 13D). Sin embargo, cuando se utilizaba un anticuerpo del activador transcripcional SRC-1 en el inmunoprecipitado, la unión disminuía (Fig. 13D).

Como se describió anteriormente, se sugirió que ERAP1 era uno de los genes diana de RE α , y que era regulado por un mecanismo de retroalimentación positiva en la que si se inducía la activación de RE α de una manera dependiente de E2, la expresión del mismo se aceleraba. A continuación, se examinó la influencia del péptido ERAP1 sobre la expresión del propio ERAP1. Como se muestra en la Fig. 13A, se reconoció que ERAP1 tenía una expresión acelerada de manera dependiente de E2, pero la expresión del mismo fue suprimida temporalmente

mediante la administración del péptido ERAP1. De lo descrito anteriormente se encontró que el péptido ERAP1 inhibía el mecanismo de retroalimentación positiva de ERAP1 en las células de cáncer de mama positivas para ER α dependientes de E2, y como consecuencia, inducían la disociación de PHB2/REA, e inhibían cada mecanismo de activación de ER α , y así inducían el efecto de supresión de la proliferación celular.

5 [Ejemplo 2] Efecto de supresión del péptido ERAP1 en células MCF-7 resistentes al tamoxifeno

1. Materiales y métodos

Células MCF-7 resistentes a tamoxifeno

Como líneas celulares MCF-7 resistentes a tamoxifeno, se ofrecieron las proporcionadas por el Dr. Satoshi Inoue (Centro de Investigación de la Universidad de Medicina de Saitama para la Medicina Genómica) bajo un acuerdo de transferencia de material para el experimento que se describe a continuación. El cultivo de células MCF-7 resistente al tamoxifeno se realizó bajo las condiciones recomendadas por el depositante. Las células MCF-7 resistentes a tamoxifeno se cultivaron en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) reforzado con 10% de FBS (Nichirei Biosciences, Tokio, Japón), 1% de penicilina/estreptomicina (Nacalai tesque, Kyoto, Japón), tamoxifeno 1 μ M (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.).

15 Efecto de la supresión de la proliferación del péptido ERAP1 en células MCF-7 resistentes a tamoxifeno

El ensayo de proliferación celular se evaluó mediante un recuento celular Kit-8 (CCK-8, fabricado por la empresa Dojindo). En primer lugar, se sembraron células MCF-7 a tamoxifeno resistentes a 2×10^4 /pocillo en una placa de 48 pocillos en medio de cultivo DMEM/F12 que contenía rojo de fenol y se pusieron en una incubadora de CO₂ durante 24 horas. A continuación, el medio de cultivo se cambió con medio de cultivo DMEM/F12 que contenía 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y tamoxifeno 1 μ M y que no contenía rojo de fenol, y las células fueron pre-cultivadas además durante 24 horas. Se retiró el sobrenadante, y después se añadieron 180 μ l del péptido ERAP1 en cada concentración, y posteriormente se añadieron 20 μ l de E2 100 nM (concentración final: 10 nM), y se hizo reaccionar la mezcla durante 24 horas. La solución de reacción se retiró, y después se añadieron 125 μ l de solución 10 veces diluida de CCK-8 a cada pocillo, y la reacción de coloración se realizó durante 1 hora en una incubadora de CO₂. Entonces, se trasladaron 100 μ l a una placa de 96 pocillos de cada pocillo, y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas.

Investigación para el efecto de supresión del péptido ERAP1 en la fosforilación de Akt, MAPK y RE α en células MCF-7 resistentes a tamoxifeno

Células MCF-7 y células MCF-7 resistentes a tamoxifeno fueron sembradas a 1×10^5 /pocillo en medio de cultivo DMEM/F12 que contenía rojo de fenol en una placa de 24 pocillos y colocadas en una incubadora de CO₂ durante 24 horas. A continuación, el medio de cultivo se cambió con medio de cultivo DMEM/F12 que contenía 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y tamoxifeno 1 μ M, y sin rojo de fenol, y las células fueron además pre-cultivadas durante 24 horas. Se retiró el sobrenadante, y después se añadieron 180 μ l de péptido ERAP1 100 μ M (concentración final: 10 μ M), y posteriormente se añadieron 20 μ l de E2 100 nM (concentración final: 10 nM), y se hizo reaccionar la mezcla durante 24 horas. La solución de reacción se retiró, y se añadieron luego 100 μ l de tampón de muestra de SDS y se lisaron las células. Las células se sometieron a tratamiento de ebullición a 95°C durante 5 minutos, y se sometieron a electroforesis de amida poliacrílica. Las fosforilaciones de Akt y MAPK se detectaron con anticuerpos de Akt anti-fosforilación (Ser473) (587F11) y p44/42 MAP quinasa anti-fosforilación (Thr202/Tyr204), y se detectó la fosforilación de RE α con anticuerpos de RE α anti-fosforilación (Ser104/106), RE α anti-fosforilación (Ser118), RE α anti-fosforilación (Ser167), RE α anti-fosforilación (Ser305) y RE α anti-fosforilación (Tyr537).

2. Resultados

Se investigó la influencia del péptido ERAP1 sobre la proliferación celular en células MCF7 resistentes a tamoxifeno (Tam-R MCF-7). Después de 24 horas de la administración del péptido ERAP1, se reconoció que el péptido ERAP1 suprimía notablemente la proliferación celular en forma dependiente de la dosis en presencia de E2 y tamoxifeno (Fig. 14A). A continuación, se investigaron las influencias de la "activación de la ruta no genómica de tamoxifeno (fosforilaciones Akt y MAPK)" y la "fosforilación de RE α por el tamoxifeno" en la activación de RE α , lo que había sido considerado hasta ahora una de las causas de la resistencia al tamoxifeno. Cuando las células Tam-R MCF-7 fueron sometidas a un tratamiento con tamoxifeno solo o tratamiento concomitante de tamoxifeno y E2, se reconoció que cada uno de ellos aceleraba las fosforilaciones de Akt y MAPK (Fig. 14B, el panel superior). Por el contrario, cuando las células Tam-R MCF-7 eran sometidas a un tratamiento del péptido ERAP1 en cada condición, se reconoció que las fosforilaciones de Akt y MAPK eran notablemente disminuidas de manera similar en la línea celular MCF-7 de tipo salvaje (MCF 7wt). Además, se encontró que todas las fosforilaciones de RE α eran también reducidas (Fig. 14B, el panel inferior). De lo descrito anteriormente se sugirió que el péptido ERAP1 también inhibía la activación de la ruta no genómica y la fosforilación de RE α , lo que era una de las causas del cáncer de mama resistente a tamoxifeno en el cáncer de mama resistente al tamoxifeno, y que, por lo tanto, podía inducir a la supresión de la proliferación celular.

[Ejemplo 3] Estudio de los efectos del péptido ERAP1 sobre la proliferación celular independiente de E2

1. Materiales y métodos

Investigación de los efectos del péptido ERAP1 sobre la proliferación celular independiente de E2

5 Células MCF-7 o células ZR-75-1 se sembraron a 2×10^4 /pocillo, y se sembraron células KPL-3C a 1×10^4 /pocillo en una placa de 48 pocillos, y se pusieron en una incubadora de CO₂ durante 24 horas. Entonces, para las células MCF-7, el medio de cultivo se cambió con medio de cultivo DMEM/F12 que contenía 10% de FBS (Nichirei Biosciences, Tokio, Japón), 1% de solución de antibiótico/antimicótica (Invitrogen), NEAA48 0,1 mM (Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM y 10 µg/ml de insulina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y sin rojo de fenol, y las células fueron además pre-cultivadas durante 24 horas. Por otro lado, para las células ZR-75-1 y las células KPL-3C, los medios de cultivo se cambiaron con medio de cultivo RPMI que contenía 10% de FBS y 1% de solución de antibiótico/antimicótica y sin rojo de fenol, y las células se pre-cultivaron además durante 24 horas. Se retiró el sobrenadante, y se añadieron luego 200 µl del péptido ERAP1 a cada concentración o tamoxifeno como control positivo, respectivamente, y se hizo reaccionar la mezcla durante 24 horas. La solución de reacción se retiró, y después se añadieron 125 µl de solución 10 veces diluida de CCK-8 a cada pocillo, y la reacción de coloración se realizó durante 1 hora en una incubadora de CO₂. Entonces, 100 µl de cada pocillo se trasladaron a una placa de 96 pocillos, y la absorbancia a 450 nm se midió con un lector de microplacas.

Investigación de la influencia del péptido ERAP1 en la ruta de activación no genómica a través de IGF-1Rβ

20 Células MCF-7 se sometieron a un tratamiento del péptido ERAP1 10 µM solo, estimulación con E2 10 nM solo, y co-estimulación con el péptido ERAP1 y E2, respectivamente, y después de 24 horas, la fracción del citoplasma se aisló de las células de cada tratamiento. La fracción de citoplasma se sometió a limpieza previa utilizando IgG normal y rec-Protein G Sepharose 4B (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.) a 4°C durante 3 horas, y se centrifugó, y luego el sobrenadante se incubó en presencia de anticuerpo anti-REα a 4°C durante 6 horas. Después, se añadió al sobrenadante rec-Protein G Sepharose 4B y se incubó a 4°C durante 1 hora con lo que precipitó un complejo antígeno-anticuerpo. El complejo de la proteína inmunoprecipitada se lavó con tampón de lisis tres veces, y se separó por SDS-PAGE. Entonces, los anticuerpos anti-IGF-1Rβ, anti-REα, anti-Shc y anti-PHB2 fueron utilizados en la detección de cada proteína completa, y el anticuerpo anti-fosforilación de tirosina se utilizó en la detección de la fosforilación de la tirosina de cada proteína mediante inmunotransferencia Western.

2. Resultados

30 La influencia del tratamiento del péptido ERAP1 en ausencia de E2 sobre la proliferación celular se examinó con el ensayo MTT. A saber, células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 a cada concentración (1, 3, 5 y 10 µM) o TAM como control positivo durante 24 horas. Como consecuencia, se reconoció el efecto de supresión de la proliferación celular dependiente de la dosis del péptido ERAP1 (Fig. 15A).

35 A continuación, se investigó el mecanismo molecular para el efecto. La influencia sobre la activación independiente de estrógenos de la ruta no genómica de RE se examinó de la misma manera que la activación dependiente de estrógenos de la ruta no genómica. La unión de REα a PHB2 en el citoplasma fue reconocida con el tratamiento con el péptido ERAP1, mientras que cada interacción de IGF-1Rβ y Shc, y REα se inhibió. Como consecuencia, se encontró que la fosforilación de tirosina de IGF-1Rβ y Shc importante para la cascada de señales también era suprimida (Fig. 15B). De lo descrito anteriormente se sugirió que la proliferación independiente de E2 también se inhibió en las células MCF7 positivas para ER.

40 Además, con el fin de verificar estos resultados, el efecto de supresión de la proliferación se examinó utilizando otras líneas celulares de cáncer de mama positivas para ER. La administración del péptido ERAP1 10 µM se llevó a cabo cada 24 horas. Por lo tanto, un significativo efecto de supresión de la proliferación celular se confirmó a las 48 horas en células KPL3, y a las 96 horas en células ZR75-1 (Fig. 16). De lo descrito anteriormente se encontró que el péptido ERAP-1 inhibe la unión de ERAP1-PHB2 y causa el efecto de supresión de la proliferación de células de cáncer de mama positivas para ER independientes de E2.

[Ejemplo 4] Investigación del efecto del uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno

1. Materiales y métodos

Efecto de reducción de ERAP1 en células de cáncer de mama

50 El efecto de inhibición del tamoxifeno cuando ERAP1 era reducido por el método de siRNA se evaluó con el ensayo MTT. Las secuencias de si-ERAP1, y el si-control (si-EGFP) y el método para el experimento estaban de acuerdo con lo publicado en Kim et, al. (Cancer Science, 2009, 100; 1468-1478). Células MCF-7 fueron sembradas a 2×10^4 /pocillo en una placa de 48 pocillos, y se estimularon con E2 1 µM, y después de 24 horas, se trataron con si-ERAP1 o si-control. Después de 24 horas, las células se trataron con tamoxifeno 10 µM y se evaluó el número de células vivas con el ensayo MTT después de 96 horas.

Además, el efecto de inhibición de tamoxifeno cuando ERAP1 fue reducido por el método de siRNA se evaluó con el ensayo de ERE-luciferasa. Células MCF-7 fueron sembradas a 2×10^4 /pocillo en una placa de 96 pocillos y se transfectaron temporalmente con el indicador de ERE-luciferasa. A continuación, las células se estimularon con E2 1 μ M, y después de 24 horas, se trataron con si-ERAP1 o si-control. Después de 24 horas, las células se trataron con 10 μ M de tamoxifeno y después de 96 horas, se midió la actividad de ERE luciferasa.

Prueba para la inhibición in vivo de la proliferación del tumor

Células KPL-3 fueron trasplantadas por vía subcutánea en el cuerpo graso de la mama de ratones desnudos BALB/c. Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 50-80 mm³, en ausencia de E2, se inició la prueba de tratamiento (5 individuos/grupo) (día 0). A los ratones portadores del heterotransplante de tumor KPL-3C se les administró el péptido ERAP1 solo (3,5, 7 y 14 mg/kg), el péptido codificado solo (14 mg/kg), el tamoxifeno solo (4 mg/kg) o una combinación del péptido ERAP1 (14 mg/kg) y tamoxifeno (4 mg/kg) cada día mediante inyección intraperitoneal.

Análisis del ciclo celular

Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 10 μ M y/o tamoxifeno 10 nM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Después de la inmovilización, las células se tiñeron con yoduro de propidio, y se analizaron por citometría de flujo.

2. Resultados

Influencia de la reducción de ERAP1 en el efecto de supresión de la proliferación de células de cáncer de mama por el tamoxifeno

Se investigó el efecto de la inhibición del tamoxifeno cuando la expresión de ERAP1 era suprimida en células MCF-7 mediante el método de siRNA. Se confirmó que la proliferación de células se suprimía más en el caso en el que las células transfectadas con siERAP1 era tratadas con tamoxifeno que en el caso en el que las células transfectadas con Si-control se trataban con tamoxifeno (Fig. 17A). Además, la actividad del indicador de ERE fue examinada en ese momento. Por lo tanto, se confirmó de manera similar que la actividad del indicador era suprimida más en el caso en el que las células transfectadas con siERAP1 eran tratadas con tamoxifeno (Fig. 17B). De lo descrito anteriormente se sugirió que el efecto de la supresión de la proliferación celular sinérgico puede ser inducido por la supresión de la expresión de ERAP1 y el uso concomitante del péptido ERAP1 y tamoxifeno.

Investigación del efecto antitumoral por el uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno

El efecto antitumoral por el uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno se investigó usando un modelo de ratón desnudo BALB/c a los que fueron trasplantados ortotópicamente a la glándula mamaria células KPL-3. Con respecto a la proliferación del cáncer de mama dependiente de estrógenos, la administración del péptido ERAP1 solo fue reconocida que tenía un efecto antitumoral dependiente de la dosis (3,5, 7 y 14 mg/kg), pero en el caso de la administración del péptido-codificado solo (14 mg/kg), el efecto no fue reconocido (Fig. 18). Se reconoció que el uso concomitante del péptido ERAP1 (14 mg/kg) y tamoxifeno (4 mg/kg) tenía un efecto antitumoral más notable (Fig. 18). El cambio del peso corporal no fue reconocido en ninguno de los métodos de administración. De lo descrito anteriormente se encontró que el péptido ERAP1 inhibía la señal de estrógeno de ER, y por lo tanto también exhibía un notable efecto antitumoral in vivo, cuyo efecto se mejoraba aún más por el uso concomitante con tamoxifeno.

Influencia del uso concomitante de péptido ERAP1 y el tamoxifeno sobre el ciclo celular

La influencia del uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno sobre el ciclo celular se examinó por análisis de FACS. Cuando las células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 μ M solo o tamoxifeno 10 nM solo, se confirmó el aumento de células que se habían detenido en la fase G1. Sin embargo, cuando se utilizaban el péptido ERAP1 10 μ M y tamoxifeno 10 nM de forma concomitante, las células en la fase subG1 aumentaban notablemente, siendo reconocida la muerte celular (Fig. 19). De lo descrito anteriormente se encontró que el uso concomitante del péptido ERAP1 y el tamoxifeno, que tienen diferentes mecanismos de acción, promueve notablemente el efecto antitumoral in vitro e in vivo también.

[Ejemplo 5] Estudio de los efectos de supresión de la proliferación de células de cáncer de mama de péptidos que tienen diferentes secuencias

1. Materiales y métodos

Con el fin de confirmar si un péptido con una secuencia diferente del péptido ERAP1 usado en los Ejemplos anteriormente proporcionaba efectos similares o no, el péptido ERAP1-2 (residuos de aminoácido 161-173: ATLSQMLSDLTLQ (SEQ ID NO: 30)) fue construido, el cual tenía una secuencia diferente del péptido ERAP1 y estaba compuesto por los 3 residuos de aminoácido estimados como el sitio de unión a PHB2/REA (Fig. 20, el panel inferior). El ensayo de proliferación celular se evaluó utilizando el recuento de células Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japón). En primer lugar, fueron sembradas células MCF-7 a 2×10^4 /pocillo en medio de cultivo

DMEM/F12 que contenía FBS al 10% y 1% de solución de antibiótico/antimicótico y sin adición de rojo fenol en una placa de 48 pocillos, y se situaron en una incubadora de CO₂. Entonces, se añadieron 180 µl del péptido ERAP1 (165-177 residuos de aminoácidos) o el péptido ERAP1-2: (PEP-1 161-173 residuos de aminoácidos) en cada concentración, posteriormente se añadieron 20 µl de E2 100 nM (concentración final: 10 nM), y se hizo reaccionar la mezcla durante 24 horas. La solución de reacción se retiró, y después se añadieron 125 µl de solución 10 veces diluido CCK-8 a cada pocillo, y la reacción de coloración se realizó durante 1 hora en una incubadora de CO₂. Entonces, 100 µl de cada pocillo fueron trasladados a una placa de 96 pocillos, y la absorbancia a 450 nm se midió con un lector de microplacas.

2. Resultados

Se reconoció que, en la misma forma que el péptido ERAP1, la administración del péptido ERAP1-2 también suprimía la proliferación celular dependiente de E2 de una manera dependiente de la dosis hasta 24 horas (Fig. 20, el panel superior). De esto, se sugirió que la péptido ERAP1-2 también causaba la supresión de la proliferación celular de células de cáncer de mama por un mecanismo similar al del péptido ERAP1 analizado en los Ejemplos anteriores. Además, se sugirió que la secuencia de 165-173 residuos de aminoácidos (QMLSDLTLQ (SEQ ID NO: 31)), que era la secuencia de superposición del péptido ERAP1 y el péptido ERAP1-2, estaba implicada en la supresión de la proliferación celular de células de cáncer de mama.

[Ejemplo 6] Investigación para la fosforilación de PHB2 en líneas de células de cáncer de mama RE α -positivas/ERAP1-negativas

1. Materiales y métodos

Fraccionamiento de núcleo/citoplasma

Con el fin de evaluar la localización de PHB2, células HCC1395 de la línea celular de cáncer de mama RE α -positivas/ERAP1-negativas fueron tratadas con el péptido ERAP1 y/o E2. Después, los extractos del citoplasma y el núcleo de las células HCC1395 se prepararon usando un reactivo de extracción nuclear y citoplásmico NE-PER (Thermo Fisher Scientific).

Efectos del péptido ERAP1 en células HCC1395 de la línea celular de cáncer de mama RE α -positivas/ERAP1-negativas

El ensayo de proliferación de células HCC1395 se evaluó utilizando el recuento de células Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japón). En primer lugar, fueron sembradas células HCC1395 a 2×10^4 /pocillo en medio de cultivo RPMI que contenía 10% de FBS y 1% de solución de antibiótico/antimicótico y sin adición de rojo fenol en una placa de 48 pocillos, y se situaron en una incubadora de CO₂. Después, se añadieron 180 µl del péptido ERAP1 a cada concentración, y posteriormente se añadieron 20 µl de E2 100 nM (concentración final: 10 nM), y se hizo reaccionar la mezcla durante 96 horas. La solución de reacción se retiró, y después se añadieron 125 µl de solución 10 veces diluida de CCK-8 a cada pocillo, y la reacción de coloración se realizó durante 1 hora en una incubadora de CO₂. Entonces, 100 µl de cada pocillo se trasladaron a una placa de 96 pocillos, y la absorbancia a 450 nm se midió con un lector de microplacas.

Fosforilación de PHB2 por tratamiento del péptido ERAP1

Células MCF-7 y células HCC1395 fueron tratadas con péptido ERAP1 5 µM. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 1 µM durante 24 horas. Entonces, la fracción nuclear se aisló de las células de cada tratamiento. La fracción nuclear se sometió a limpieza previa a 4°C durante 3 horas utilizando IgG normal y rec-Protein G Sepharose 4B (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.), y se centrifugó, y luego el sobrenadante se incubó en presencia de un anticuerpo anti-RE a 4°C durante 6 horas. Después, se añadió el sobrenadante con rec-Protein G Sepharose 4B y se incubó a 4°C durante 1 hora para precipitar un complejo antígeno-anticuerpo. El complejo de la proteína inmunoprecipitada se lavó con un tampón de lisis tres veces, y se separó por SDS-PAGE. Entonces, el anticuerpo anti-RE α y el anticuerpo anti-PHB2 fueron utilizados en la detección de cada proteína completa por transferencia Western, y un anticuerpo anti-fosforilación de tirosina, un anticuerpo de serina anti-fosforilación, y un anticuerpo de treonina anti-fosforilación se utilizaron en la detección del ácido fosfórico de PHB2.

Influencia del residuo serina en la posición 39 de PHB2 sobre la actividad transcripcional de RE α

Usando construcciones de vectores de expresión en las que el residuo de serina en la posición 39 de PHB2 se mutaba con alanina y ácido glutámico, se investigó la influencia de la estimulación de E2 en la actividad de ERE. Células COS-7 se transfectaron con PHB2 (o vector de mutación PHB2), RE α , vector ERE-luciferasa y cada plásmido de pRL-TK como un patrón interno por el reactivo de transfección FuGENE6. Después de 6 horas, las células se estimularon con E2 1 µM durante 48 horas. Las células se recogieron, y se evaluaron las actividades de luciferasa y Renilla-luciferasa usando el ensayo dual indicador de luciferasa de Promega (Tokio, Japón). En consideración a la eficiencia de la transfección, todos los datos se estandarizaron con la actividad de Renilla luciferasa.

2. Resultados

De los resultados conseguidos hasta ahora se demostró la posibilidad de que ERAP1 era uno de los genes diana de $RE\alpha$, y que estaba regulado por un mecanismo de retroalimentación positiva en el que si se inducía la activación de $RE\alpha$ de una manera dependiente de E2, la expresión del mismo se aceleraba. Además, se confirmó que la disociación inducida por el péptido ERAP1 de PHB2/REA a partir de ERAP1 en células de cáncer de mama positivas para $RE\alpha$, como consecuencia, inhibía el mecanismo de retroalimentación positiva de ERAP1, e inhibía cada mecanismo de activación ER induciendo el efecto de supresión de la proliferación de células. Sin embargo, las células de cáncer de mama ER-positivas ERAP1-negativas también estaban presentes, y el mecanismo para la expresión acelerada del gen diana de RE en tales células no se ha encontrado. Además, REA/PHB2 se une directamente a RE que tienen una función de suprimir la activación del mismo como se describió anteriormente. De esto, el papel de PHB2/REA como factor de supresión de RE en las células de cáncer de mama ERAP1-negativas y ER-positivas no está claro. En consecuencia, la translocación nuclear de PHB2 usando células HCC1395 de la línea celular de cáncer de mama negativas para ERAP1 y positivas para RE se investigó primero (Fig. 21).

En células HCC1395, fue reconocida la translocación nuclear de PHB2/REA únicamente con el tratamiento de E2 (fig. 21A), y además la unión a $RE\alpha$ en el núcleo se confirmó por el método de inmunoprecipitación (Fig. 21B). Se investigó el reclutamiento de cada factor de acoplamiento de $RE\alpha$ en el momento. Como consecuencia, los cambios cuantitativos del factor de supresión de acoplamiento NCoR y la enzima de desacetilación HDAC1, no fueron reconocidos por la presencia o ausencia del tratamiento con E2, pero la unión a $RE\alpha$ se reconoció. Sin embargo, la unión de $RE\alpha$ con un factor de activación de acoplamiento SRC-1 no fue reconocida en ninguna de las condiciones.

De los resultados anteriores se encontró que PHB2 se translocaba en el núcleo en forma dependiente de E2 y se unía directamente al $RE\alpha$ nuclear, y reclutaba un factor de supresión de acoplamiento NCoR y una enzima de desacetilación HDAC1 en células HCC1395 que eran células del cáncer de mama negativas para ERAP1 y positivas para RE. Además, la influencia del péptido ERAP1 sobre la proliferación celular no fue reconocida (Fig. 21C). Sin embargo, esta línea celular HCC1395 fue reconocida por la proliferación celular dependiente de E2 (Fig. 21C). De esto, los inventores se centraron en la modificación posterior a la traducción, en particular, la fosforilación de PHB2/REA con respecto al mecanismo para PHB2/REA para dirigir $RE\alpha$ a la inactivación, y se consideró la hipótesis de que la supresión de la actividad de $RE\alpha$ estaba regulada por la presencia o ausencia de la fosforilación de PHB2/REA.

Se ha informado hasta ahora que las regiones importantes para la supresión de la actividad de $RE\alpha$ por PHB2/REA son 19-49 aminoácidos y 150-174 aminoácidos (PNAS, 1999, 96, 6947-6952). Además, se ha informado que PHB2/REA se fosforila en los residuos de serina en la posición 39 y treonina en la posición 42 en el análisis de fosforilación completa (JBC, 283, 4699-4713, 2008). Como se describió anteriormente, los inventores se centraron en estas fosforilaciones de 39S y 42T, y realizaron el experimento descrito a continuación.

En células MCF-7 de la línea de cáncer de mama ER-positivo/ERAP1-positivo, la unión de PHB2 a $RE\alpha$ en el núcleo con la administración del péptido ERAP1 en presencia de E2 fue reconocida, y fueron reconocidas más fosforilaciones de los residuos de tirosina y serina en la unión PHB2/REA reconocida, mientras que la fosforilación en el residuo de treonina no fue tan reconocida. Por otro lado, en células HCC1395, PHB2/REA fue translocado en el núcleo por el tratamiento con E2, y unido a $RE\alpha$, y en tal PHB2/REA, se reconoció la fosforilación del residuo de tirosina, mientras que la fosforilación del residuo de serina no se confirmó. Estos resultados sugieren que 39S en la región importante para la supresión de la actividad por el PHB2/REA descrito anteriormente era un sitio candidato para la fosforilación. Luego, células COS-7 se transfectaron temporalmente con PHB2/REA tipo normal, una construcción del vector de expresión (S39A) en la que 39S de PHB2/REA se sustituía por alanina, o un constructo del vector de expresión (S39E) en el que 39S de PHB2/REA era sustituido con un residuo de ácido glutámico que podía hacer constitutivamente el estado similar al estado de fosforilación, junto con $RE\alpha$, vector ERE-luciferasa, y cada vector de pRL-TK como un estándar interno. A continuación, las células fueron tratadas con E2, y se examinó la actividad del indicador ERE. Como consecuencia, la actividad de $RE\alpha$ fue suprimida en las células a las que se introdujo PHB2/REA tipo normal. Por otro lado, la supresión de la actividad de $RE\alpha$ no fue reconocida en las células a las que se introdujo el constructo de mutación S39A. Además, también en el constructo de S39E, se reconoció la supresión de la actividad de $RE\alpha$ (Fig. 22B). De lo descrito anteriormente se sugirió que la fosforilación del residuo de serina en la posición 39 era importante en la supresión de la actividad de $RE\alpha$ por PHB2/REA, y en las células de cáncer de mama positivas para ER que no tienen expresión de ERAP1, la fosforilación fue suprimida y, por tanto, PHB2/REA se convirtió en un tipo inactivo.

[Ejemplo 7] Expresión de ERAP1 y PHB2 en la línea celular de cáncer de mama humano y en las muestras de cáncer de mama humano extirpadas

1. Materiales y métodos

Análisis para la expresión de ERAP1 en líneas celulares de cáncer de mama

- 5 Los lisados celulares de las líneas de células humanas positivas para ER de cáncer de mama (KPL-3L, BT-474, ZR-75-1, YMB-1, T47D, HBC4, y KPL-1) y las células epiteliales mamarias (MCF-10A) se sometieron a inmunotransferencia usando el anticuerpo anti-ERAP1, el anticuerpo anti-PHB2 y el anticuerpo anti-RE α .

Análisis de la expresión de ERAP1 y PHB2 en muestras de cáncer de mama humano extirpadas

- 10 Las expresiones de ERAP1 y PHB2/REA se evaluaron con tinción de tejidos inmune usando el anticuerpo anti-ERAP1 (diluido 75 veces, 7 horas, 4°C) y el anticuerpo anti-PHB2 (diluido 300 veces, 12 horas, 4°C) para 103 casos de especímenes de cáncer de mama extirpados embebidos en parafina. La determinación de la capacidad de tinción de la parte de cáncer por inmunotinción se realizó de tal manera que en el caso de que el tejido de cáncer no se teñía en absoluto entonces se determinaba como negativo, en el caso en el que el citoplasma se teñía ligeramente se determinaba como positivo débil, y en el caso en el que el tejido de cáncer era casi uniformemente fuertemente
- 15 teñido se determinaba como fuertemente positivo. Los resultados de esta tinción de tejidos inmunes fueron confirmados por los patólogos, y se evaluó la intensidad de la tinción de cada caso de forma independiente por tres investigadores. Para conocer la correlación entre la expresión de ERAP1 y el período de supervivencia sin recaídas del caso respectivo, fue preparada una curva de supervivencia sin recaídas con el método de Kaplan-Meier utilizando Statview J-5.0, y se evaluó con la prueba Logrank.

20 2. Resultados

Expresión de ERAP1 en líneas celulares de cáncer de mama

Se investigaron las expresiones de ERAP1, PHB2 y RE α de líneas celulares de cáncer de mama humano positivas para RE. En los cánceres de mama positivos para RE, todas las líneas celulares, excepto la HCC1395, fueron confirmadas para la expresión de ERAP1 (figura 23 y Cancer Science, 2009; 100: 1468-1478).

25 Expresiones de ERAP1 y PHB2 en muestras de cáncer de mama humano extirpado

- La expresión de ERAP1 se evaluó por tinción de tejidos inmune en especímenes de cáncer de mama extirpados. Entre los 103 casos evaluados, era Negativo cuando el tejido canceroso no estaba teñido en absoluto; fueron 24 casos (23%); era Débil cuando el citoplasma se teñía ligeramente; fueron 59 casos (57%); y era Fuerte cuando el tejido canceroso estaba casi uniformemente fuertemente teñido; fueron 20 casos (19%) (Fig. 24A, panel superior).
- 30 Por otra parte, los respectivos casos se clasificaron en Débiles (casos negativos y casos positivos débiles) y Fuertes (positivos fuerte), y se evaluaron con una curva de supervivencia sin recaídas construida para la correlación entre la expresión de ERAP1 y el período de supervivencia sin recaídas con el método de Kaplan-Meier. Como consecuencia, se reconoció que la expresión de ERAP1 se correlacionaba significativamente con el período de supervivencia sin recaídas (Fig. 24A, panel inferior).

- 35 Además, la expresión de PHB2 se evaluó de manera similar con la tinción del tejido inmune. Como consecuencia, casi todos los casos de los especímenes de cáncer de mama extirpados investigados fueron positivos fuerte (Fuerte) (Fig. 24B).

[Ejemplo 8] Investigación para el mecanismo de acción del péptido ERAP1 en células de cáncer de mama humano

1. Materiales y métodos

40 Líneas celulares

- Las líneas de células humanas de cáncer de mama (MCF-7, ZR-75-1, BT-474, T47D, y HCC1395) fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.). KPL-3C fue proporcionada por el Dr. Junichi Kurebayashi (Escuela de Medicina de Kawasaki, Okayama, Japón) bajo un acuerdo de transferencia de material. HEK293T se adquirió de RIKEN (Ibaraki, Japón). Todas las líneas de células se cultivaron en las condiciones
- 45 recomendadas por cada depositante.

Tratamiento de las células

- Las células MCF-7 se suspendieron en MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) reforzado con 10% de FBS (Nichirei Biosciences, Tokio, Japón), 1% de solución antibiótica/antimicótica (Invitrogen), NEAA 0,1 mM (Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM y 10 μ g/ml de insulina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). A continuación, la suspensión obtenida se sembró en una placa de 4 pocillos (1 $\times$ 10⁵ células/1 ml), una placa de 6 pocillos (5 $\times$ 10⁵ células/2 ml) o plato de 10
- 50 cm (2 $\times$ 10⁶ células/10 ml). Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía 5% de dióxido de carbono a 37°C. Al día siguiente de la siembra, el medio de cultivo se cambió a DMEM/F12 sin rojo de fenol

(Invitrogen) reforzado con FBS, una solución antibiótica/antimicótica, NEAA, piruvato de sodio e insulina. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con 17β estradiol 10 nM (E2, Sigma). En la prueba de inhibición, se añadió el péptido ERAP1 justo antes de la estimulación con E2.

Ensayo indicador de luciferasa

- 5 Células HEK293T fueron transfectadas con un indicador ERE disponible en el mercado (SABiosciences, Frederick, MD, EE.UU.) y un indicador ERE del gen PP1 α (secuencia tándem formada por el motivo ERE 5' aguas arriba y el motivo ERE de 5' aguas arriba y el intrón 2) y pRL-TK como patrón interno. Después de 16 horas de la transfección, el medio de cultivo se cambió a un medio de cultivo de ensayo (Opti-MEM, 10% FBS). Después de 24 horas de la transfección, las células fueron tratadas con E2 10 nM durante 24 horas. Las células se recogieron y las actividades de luciferasa y Renilla luciferasa fueron evaluadas con el ensayo indicador dual de luciferasa de Promega (Tokio, Japón). En consideración a la eficiencia de la transfección, todos los datos se estandarizaron con la actividad de Renilla luciferasa.

Análisis de transferencia Western

- 15 Las células se lisaron con un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM: pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,1% de NP-40, 0,5% de CHAPS) que contenía 0,1% de cóctel inhibidor de proteasa III (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.). El lisado celular se sometió a electroforesis, y se transfirió sobre una membrana de nitrocelulosa, y se bloqueó con una solución BlockAce 4% (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japón) durante 1 hora. La membrana se incubó en presencia de los anticuerpos descritos a continuación durante 1 hora:

Anticuerpos anti- β -actina (AC-15) (Sigma);

- 20 Anticuerpo purificado anti-ERAP1 (anti-hA7322 (His13)) (Sigma);

Anticuerpo anti-FLAG-tag M2 (Sigma);

Anticuerpo anti-HA-tag (Roche, Mannheim, Alemania);

Anticuerpo anti-PHB2/REA (Abcam, Cambridge, Reino Unido);

Anticuerpo anti-RE α (AER314) (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, EE.UU.);

- 25 Anticuerpo anti- α / β -tubulina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-Akt (PKB) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-fosforilación de Akt (Ser473) (587F11) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-p44/42 de MAP quinasa (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

- 30 Anticuerpo anti-fosforilación de p44/42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-PP2A de subunidad A (81G5) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-Lamin B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.);

Anticuerpo anti-PKA II α reg (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.); o

Anticuerpo anti-PP1 (FL-18) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.).

- 35 Alternativamente, la membrana se incubó durante la noche en presencia de los anticuerpos descritos a continuación:

Anticuerpo purificado de PHB2/REA anti-fosforilación (Ser39) (Scrum, Tokio, Japón);

Anticuerpo anti-fosforilación de tirosina (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.);

anticuerpo anti-fosforilación de serina (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.); o

anticuerpo anti-fosforilación de treonina (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.).

- 40 La membrana se incubó en presencia de un anticuerpo secundario unido a HRP (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora. A continuación, la membrana se desarrolló con el sistema de quimioluminiscencia (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). La transferencia se escaneó usando el lector de imágenes LAS-3000 mini (Fujifilm, Tokio, Japón).

Inmunoprecipitación

Como se describe en el punto "Análisis de transferencia Western", las células se lisaron con tampón de lisis NP-40 0,1%. El lisado celular se sometió a limpieza previa utilizando IgG normal y rec-proteína G Sepharose 4B (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.) a 4°C durante 3 horas. El lisado celular se centrifugó y el sobrenadante se incubó en presencia de un anticuerpo purificado anti-ERAP1, un anticuerpo anti-PHB2/REA, un anticuerpo anti-RE α y un anticuerpo anti-FLAG-tag M2 a 4°C durante 6 horas. Entonces, el sobrenadante se incubó en presencia de rec-Protein G Sepharose 4B a 4°C durante 1 hora para precipitar un complejo antígeno-anticuerpo. El complejo de la proteína inmunoprecipitada se lavó con un tampón de lisis tres veces, y se separó por SDS-PAGE. A continuación, se realizó el análisis de transferencia Western.

10 Fraccionamiento del núcleo y el citoplasma

Con el fin de evaluar la localización y la fosforilación de PHB2/REA, se realizó la inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-PHB2/REA en presencia de rec-proteína G Sepharose utilizando los extractos del núcleo y el citoplasma de células MCF-7. Los extractos del núcleo y del citoplasma se prepararon usando el reactivo de extracción nuclear y citoplasmático NE-PER (Thermo Fisher Scientific).

15 Tinción química de células inmunes

Células MCF-7 fueron sembradas en una cámara de 8 pocillos (Laboratory-Tek II Chamber Slide System, Nalgen Nunc International, Naperville, IL, EE.UU.) a 5×10^4 células/pocillo, y se cultivaron en condiciones libres de estrógeno durante 24 horas. Células MCF-7 fueron expuestas a E2 10 nM con el péptido ERAP1 y λ -fosfatasa. Después de 24 horas, las células se trataron con paraformaldehído al 4% a 4°C durante 30 minutos para ser fijadas, y se trataron con 0,1% Triton X-100 durante 2 minutos para hacerlas permeables. Entonces, las células se recubrieron con 3% de BSA para bloquear la hibridación no específica. Después, las células se incubaron adicionalmente durante 1 hora en presencia de anticuerpo anti-PHB2/REA y anticuerpo anti-fosforilación PHB2/REA (Ser39). Las células se lavaron con PBS, y se incubaron durante 1 hora en presencia de anticuerpo anti-conejo de unión de Alexa 594 y Alexa 488 (Molecular Probe, Eugene, Oregón, EE.UU.) para ser teñidas. El núcleo fue contra teñido con dihidrocloruro de 4,6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI, Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). La imagen de fluorescencia se obtuvo bajo el microscopio Olympus IX71 (Tokio, Japón).

Inhibición in vivo de la proliferación del tumor

La suspensión de células KPL-3C (1×10^7 células/ratón) se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD), y se inyectó en la grasa corporal de mama de ratones desnudos BALB/c de 6 semanas de edad (CLEA Japan, Tokio, Japón). Los ratones se mantuvieron en una instalación aislada estéril con un periodo de ciclo de luz de 12 horas y 12 horas de periodo de oscuridad, y se alimentaron libremente con comida de roedores y agua. El tumor se cultivó más de 1 semana hasta que el tamaño del mismo alcanzó de 50 a 80 mm³ (calculado como $1/2 \times (\text{anchura} \times \text{longitud}^2)$). Entonces, los ratones se dividieron aleatoriamente en nueve grupos de tratamiento (5 individuos/grupo): grupo sin tratamiento, 6 μ g/día grupo de tratamiento de E2, E2 + 0,28 mg/día grupo de tratamiento péptido ERAP1, E2 + 0,7 mg/día grupo de tratamiento de péptido ERAP1, E2 + 1,4 mg/día grupo de tratamiento de péptido ERAP1, E2 + 0,28 mg/día grupo de tratamiento de péptido ERAP1-codificado, E2 + 0,7 mg/día grupo de tratamiento de péptido ERAP1-codificado, E2 + 1,4 mg/día grupo de tratamiento de péptido ERAP1-codificado y E2 + 83 mg/día grupo de tratamiento con tamoxifeno. Los ratones fueron tratados diariamente con 6 μ g/día de solución de E2 (100 μ l: 2,2 x 10^{-4} M) en la piel del cuello. El péptido ERAP1 o el péptido ERAP1-codificado se administraron a los ratones cada día mediante inyección intraperitoneal en 0,28, 0,7, o 1,4 mg/día (14, 35 y 70 mg/kg). El tamoxifeno también se administró intraperitonealmente a los ratones cada día en una dosis de 4 mg/kg. El volumen del tumor se midió durante 2 semanas usando calibradores. Cuando se completó el ensayo, los animales se sacrificaron, y el tumor se eliminó con el fin de evaluar la fosforilación de serina de PHB2/REA, y se trituraron en nitrógeno líquido y se sometieron a transferencia Western. Todas las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del animalario de la Universidad de Tokushima.

Actividad de fosfatasa PP1 α

La actividad fosfatasa de PP1 α se midió utilizando el Kit de ensayo de proteína fosfatasa (AnaSpec, Fremont, CA, EE.UU.). Células MCF-7 fueron tratadas con E2 y el péptido ERAP1 durante 24 horas. Entonces, la solución de lisado de células se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-PP1 α . Posteriormente, el extracto de células inmunoprecipitadas se incubó con un sustrato (fosfato de p-nitrofenilo) a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación, se detuvo la reacción, y se midió la absorbancia a 405 nm. La actividad de PP1 α (mol/min) se define como una cantidad enzimática que cataliza 1 μ mol del sustrato por 1 minuto.

PCR en tiempo real

La expresión de PP1 α se evaluó con PCR en tiempo real. El ARN completo se extrajo de las células tratadas con E2 utilizando el kit de purificación RNeasy Mini (Qiagen), y se sometió a transcripción inversa en ADNc usando transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), oligo dT cebador (Invitrogen) y mezcla dNTP 25 mM (Invitrogen). El cDNA se analizó con PCR en tiempo real en 500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SYBR

(marca registrada) Premezcla Ex Taq (Takara Bio, Shiga, Japón). Cada muestra se estandarizó con el contenido de ARNm de β 2-MG. Los cebadores usados para la amplificación son como se describen a continuación; PP1 α : 5'-ACTATGTGGACAGGGGCAAG-3' (SEQ ID NO: 58) y 5'-CAGGCAGTTGAAGCAGTCAG-3' (SEQ ID NO: 59), β 2-MG: 5'-AACTTAGAGGTGGGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 21) y 5'-CACAACCATGCCTTACTTTATC-3' (SEQ ID NO: 22).

Ensayo ChIP

El análisis ChIP se realizó utilizando EZ-ChIP (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Células MCF-7 fueron tratadas con E2 10 nM durante 24 horas, y después se fijaron con formaldehído al 37%, y se resuspendieron en tampón de lisis. Posteriormente, las células fueron destruidas con ondas ultrasónicas en 10 segundos x10 con Microson XL-2000 (Misonix, Farmingdale, NY, EE.UU.). El sobrenadante se preclaró con perlas de proteína G agarosa, y se recogió un 1% de entrada. Se llevó a cabo la inmunoprecipitación (por cada 1×10^6 células) (durante la noche, 4°C) usando anticuerpo anti-RE α e IgG de ratón, y el complejo ADN-proteína anti-RE fue sacado junto con las perlas de agarosa de proteína G (1 hora, 4°C), y se lavó, y luego, el inmunoprecipitado se volvió a suspender en un tampón de elución. A continuación, la suspensión obtenida se incubó a 65°C durante 5 horas para liberar la reticulación. Entonces, el inmunoprecipitado se purificó usando una columna de purificación accesoria. El fragmento de ADN se detectó con 28 ciclos de PCR. Como los cebadores para la región ERE del genoma de PP1 α utilizados fueron -726/-704: 5'-TCAAAGCTAATTATGGGCG-3' (SEQ ID NO: 60) y 5'-TCAAGCGATTCTCCTGCCTCA-3' (SEQ ID NO: 61), 1851/+1873: 5'-GAGATCCGCGGTCTGTGCCTG-3' (SEQ ID NO: 62) y 5'-CAGGACTGCGCTCAAGGGAGG-3' (SEQ ID NO: 63), y + 1936/+ 1959: 5'-CACTGGACCCACAGAGTTCC-3' (SEQ ID NO: 64) y 5'-TAGTTGCTCTCGGGAGGGAAA-3' (SEQ ID NO: 65).

2DICAL

Células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 μ M y péptido ERAP1-codificado. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM. A continuación, las células se fijaron con metanol. Se secaron las células bajo presión reducida, y después se trataron con tripsina en presencia de desoxicolato de sodio 2% y urea 5 M a 37°C durante 20 horas. La proteína se extrajo con acetato de etilo. Posteriormente, los extractos se secaron a presión reducida, y después se sometieron a 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of LCMS). 2DICAL es un método de análisis del proteoma en el que se obtiene temporalmente el espectro con cromatografía de líquidos de ultra baja velocidad y el análisis de masas es digitalizado y representado en un plano que tiene dos ejes, el de la relación de masa y carga (m/z) y el tiempo de retención. Los datos se calcularon como la relación con el valor a 0 horas.

Microarrays

Células MCF-7 fueron tratadas con péptido ERAP1 10 μ M. Luego, inmediatamente, las células se estimularon con E2 10 nM. A continuación, se realizó la extracción del ARN. El ARNc marcado con Cy3 fue sintetizado con el kit Low Input Quick Amp Labeling (Agilent Technologies, Loveland, CO, EE.UU.) y se hibridó con un microarray a medida a 65°C durante 17 horas. El microarray se lavó. Entonces, el producto hibridado se midió con un escáner de microarrays (Agilent). Los resultados del mismo fueron digitalizados con el software de Futuro Extraction (Agilent). Los datos se analizaron estadísticamente con el software GeneSpring (Agilent), y se calculó la relación con el valor a las 0 horas.

Biacore

Con el fin de evaluar la unión de PHB2/REA y el péptido ERAP1, se inmovilizó la proteína PHB2/REA recombinante 6xHis-marcado sobre un chip sensor (CM5) por acoplamiento de amina. A continuación, el chip se estableció con Biacore 3000 (GE Healthcare, Tokio, Japón), y se inyectó el péptido ERAP1 HA-marcado a cada concentración. La constante de velocidad de disociación se calculó con el software BIAevaluation (GE Healthcare).

Método de espectroscopia por correlación de fluorescencia

Con el fin de evaluar la unión de PHB2/REA y el péptido ERAP1, se hicieron reaccionar durante 1 hora el péptido ERAP1 10 nM FITC-marcado y el péptido ERAP1-codificado FITC-marcado, y la proteína PHB2/REA recombinante 6xHis-marcado. A continuación, la fluorescencia FITC se midió usando un dispositivo FlucDeux (MBL, Tokio, Japón), y la relación del péptido ERAP1 unido a la proteína PHB2/REA se calculó.

Purificación del anticuerpo monoclonal anti-ERAP1

Una rata (WKY/Izm, 10 semanas de edad, hembra) se sensibilizó con una secuencia parcial de ERAP1 humana (residuos 459-572 aa). Después de 2 semanas, los linfocitos se recogieron de los ganglios linfáticos ilíacos, las células se fusionaron con el mieloma de ratón SP2, y el hibridoma se cultivó. Los anticuerpos producidos por el hibridoma y tamizados se recogieron de las ascitis de ratón, y se purificaron con cromatografía de intercambio catiónico (SP HiTrap HPcolumn).

Purificación de anticuerpo de PHB2/REA (S39) anti-fosforilación

A fin de preparar el anticuerpo anti-fosforilación Ser39-específico de PHB2/REA humano, un antígeno peptídico (C + (PEG Spacer) + YGVRE pS VFTVE) fue sintetizado y conjugado con KLH y fue utilizado para sensibilizar a un conejo cinco veces cada 2 semanas. Después de 2 meses, se recogió la sangre entera, y se preparó el anti-suero, y el anticuerpo anti-fosforilación PHB2/REA (S39) se purificó con afinidad por fosforilación.

Ensayo de proliferación celular

El ensayo de proliferación celular se realizó a través del Kit-8 de recuento celular (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japón). Se recogieron las células y se sembraron a 2×10^4 células/pocillo en una placa de 48 pocillos, y se mantuvieron en una incubadora humidificada (37°C). Se añadió una solución de CCK-8 10 veces diluido en los puntos de tiempo indicados y se incubaron las células durante 1 hora. A continuación, se midió la absorbancia a 450 nm y se calculó el número de células vivas.

Análisis estadístico

Para determinar la significación estadística de la diferencia entre los grupos de ensayo, se utilizó la prueba t de Student. Valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

2. Resultados

Supresión de la actividad transcripcional de RE α por la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA

El hecho de que la fosforilación del residuo de serina en la posición 39 (Ser39) era importante para la supresión de la actividad de RE α por PHB2/REA (Fig. 22) se verificó usando el anticuerpo de fosforilación policlonal específico de anti-PHB2/REA-Ser39 fabricado anteriormente. Células HEK293T fueron transfectadas temporalmente con una construcción de vector de expresión de tipo mutación (S39A) en el que 39S de PHB2/REA tipo normal fue sustituido por alanina (Ala), o un constructo de vector de expresión (S39E) en el que 39S fue sustituido con un residuo de ácido glutámico que puede hacer constitutivamente el estado similar al estado de fosforilación, junto con RE α , vector ERE-luciferasa y cada vector de pRL-TK como estándar interno. A continuación, las células fueron tratadas con E2, y se examinó la actividad del indicador ERE. Como consecuencia, de la misma manera que en la Fig. 22, en las células en las que se introdujo PHB2/REA, se suprimió la actividad de RE α tipo normal de (WT), mientras que la supresión de la actividad de RE α no se reconoció en las células en las que se introdujo el constructo de mutación de S39A (S39A). Además, también con el constructo S39E, se reconoció la supresión de la actividad de RE α (Fig. 25A). Posteriormente, el estado de fosforilación de PHB2/REA se examinó utilizando el anticuerpo de fosforilación anti-PHB2/REA-Ser39. Como consecuencia, la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA fue reconocida sólo en las células en las que se introdujo el tipo normal de PHB2/REA, pero no se reconoció en las células en las que se introdujeron las otras construcciones (fig. 25B). Además, se examinaron las supresiones para la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA y la ruta de activación de RE no genómica dependiente de E2. Por lo tanto, la disminución de las fosforilaciones de Akt y MAPK (T201/Y204) en forma dependiente de E2 fue reconocida sólo en las células en las que se introdujo PHB2/REA tipo normal, pero no se reconoció en las células en las que se introdujeron otras construcciones (Fig. 25C). De los resultados anteriores se reveló que la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA era importante para la actividad de supresión de las rutas de activación de RE genómico y no genómico dependiente de E2 de PHB2/REA.

Estudio de la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA translocado en el núcleo

A continuación, fueron tratadas células MCF-7 con E2 y el péptido ERAP1, y luego se recogieron las fracciones de citoplasma y nucleares, y el estado de fosforilación de PHB2/REA se examinó. Como consecuencia, fue reconocida la translocación de PHB2/REA al núcleo por el péptido ERAP1 para la fosforilación de Ser39 y, además, de manera similar el PHB2/REA restante en el citoplasma se confirmó también para la fosforilación de Ser39 (Fig. 26A). Posteriormente, se examinó el cambio sucesivo de la fosforilación del residuo de serina del PHB2/REA inherente liberado por el tratamiento con el péptido ERAP1. Como consecuencia de ello, la fosforilación Ser dependiente de E2 de PHB2/REA fue reconocida de forma continua desde 1 hora a 24 horas después de la administración del péptido ERAP1 (Fig. 26B). Además, la localización del PHB2/REA inherente fosforilado también se examinó mediante tinción de células inmunes. Por lo tanto, la rápida translocación nuclear del PHB2/REA inherente fue reconocida después de la administración del péptido ERAP1 a células MCF-7, y la fosforilación de Ser39 fue reconocida (fig. 26C). Además, se detectó de manera similar con anticuerpo de fosforilación anti-Ser39 mediante la administración del péptido ERAP1 también en el PHB2/REA del citoplasma. Esta señal de fluorescencia desapareció por tratamiento con fosfatasa λ , lo que indica que el PHB2/REA localizado en el núcleo y el citoplasma disociado de ERAP1 por el péptido ERAP1 eran fosforilados. Posteriormente, se examinó la fosforilación de PHB2/REA cuando ERAP1 fue destruido por siRNA específico de ERAP1. Como consecuencia de ello, la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA en el núcleo y el citoplasma por la supresión de la expresión ERAP1 fue reconocida (Fig. 26D). Además, se encontró que la aceleración dependiente de E2 de la expresión de genes diana de RE α CCND1, TFF1 y c-Myc, se suprimía significativamente en el momento (Fig. 26E). De lo descrito anteriormente se reveló que Ser39 de PHB2/REA, liberado de ERAP1, se fosforilaba en el núcleo y en el citoplasma.

Estudio de la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA in vivo por el péptido ERAP1

Usando tumores de ratones a los que se administraba el péptido ERAP1, se examinó el estado de fosforilación de Ser39 de PHB2/REA en los tumores. Como consecuencia de ello, la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA fue confirmada en el tumor al que se administró el péptido ERAP1. Por otra parte, en el tumor al que se administró el péptido ERAP1-codificado, la fosforilación de PHB2/REA no se reconoció como en el tumor al que solamente se administró E2 (Fig. 27A). De lo descrito anteriormente se encontró que la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA también era importante en la supresión de tumores in vivo.

Estudio del efecto antitumoral in vivo del péptido ERAP1 en el cáncer de mama resistente al tamoxifeno

Posteriormente, utilizando un modelo de ratón desnudo BALB/c en el que las líneas celulares de cáncer de mama resistentes a tamoxifeno (Tam-R MCF-7) se trasplantaron ortotópicamente a la glándula mamaria, se investigó el efecto antitumoral del péptido ERAP1. El efecto antitumoral se reconoció con la administración del péptido ERAP1 (3,5, 7 y 14 mg/kg) sobre la proliferación de cáncer de mama dependiente de E2, pero no fue reconocido con el péptido ERAP1-codificado (14 mg/kg) (figura 27B). De lo descrito anteriormente se encontró que el péptido ERAP1 también exhibía un notable efecto antitumoral in vivo en el cáncer de mama resistente a tamoxifeno.

Estudio de la interacción de ERAP1 y PP1 α

Se informó a partir del estudio exploratorio de la proteína de unión de la enzima de desfosforilación, PP1 α (proteína fosfatasa 1 α), con el método de ensayo de eliminación de GST in vitro que PP1 α se unía a una longitud parcial de KIAA1244 (otro nombre de ERAP1) y el motivo de unión de PP1 α (KAVSF) se conservaba en 1228-1232 residuos de aminoácidos de ERAP1 (Chem. Biol., 16, 365, 2009). A partir de esto, en primer lugar, se verificó la interacción de PP1 α inherente y ERAP1 en células de cáncer de mama MCF-7. Como consecuencia, la unión del ERAP1 inherente y PP1 α inherente fue confirmada, y la unión adicional de PHB2/REA también fue reconocida independientemente de la presencia o ausencia de E2 (Fig. 28A). A continuación, una construcción de ERAP1 que fue déficit del motivo de unión de PP1 α (FLAG-ERAP1- Δ PP1 α) fue fabricada, y la unión a PP1 α fue investigada. Como consecuencia, la unión del constructo WT-ERAP1 y PP1 α inherente fue confirmada, pero la unión no fue reconocida en el constructo de ERAP1 (Δ PP1 α) en el que se habían eliminado 1228-1232 aa (KAVSF) (fig. 28B). Entonces, se examinó la influencia de la supresión de la expresión de PP1 α inherente usando siRNA en la interacción respectiva de ERAP1, PHB2/REA y RE α en células MCF-7. Como consecuencia, de manera interesante, en la fracción de citoplasma de las células MCF-7 en el que la expresión de PP1 α fue suprimida, la unión de ERAP1 y RE α fue reconocida, pero cuando la fracción de citoplasma se trató con el péptido ERAP1, la unión de RE α y PHB2/REA fue confirmada (Fig. 28C). Por otro lado, en la fracción nuclear, la unión de RE α y PHB2/REA fue confirmada sólo cuando la fracción nuclear se trató con el péptido ERAP1 como se ha mostrado hasta ahora (Fig. 28C). Posteriormente, también se investigaron las interacciones cuando la expresión de ERAP1 era suprimida por siRNA. Como consecuencia, la interacción de PHB2/REA y PP1 α no se pudo confirmar (Fig. 28D). Como se describió anteriormente, se encontró que ERAP1 se unía directamente a PP1 α y PHB2/REA, respectivamente, pero que PHB2/REA se unía indirectamente a PP1 α a través de ERAP1.

Influencia de la inhibición de la unión de ERAP1 y PP1 α sobre la fosforilación de PHB2/REA (S39)

A continuación, se examinó la influencia de la supresión de la expresión de PP1 α sobre la fosforilación de PHB2/REA (S39). Como consecuencia, se reconoció que la fosforilación dependiente de E2 de PHB2/REA (Ser39) era acelerada notablemente en las células tratadas con siPP1 α en comparación con las células tratadas con siEGFP como control (Fig. 29A). Entonces, también se investigó la influencia de la expresión de la construcción ERAP1 (Δ PP1 α) en la que se había eliminado la región de unión de PP1 α sobre la fosforilación de PHB2/REA (Ser39). Se reconoció que la fosforilación dependiente de E2 de PHB2/REA inherente (Ser39) era claramente acelerada en células en las que se introdujo el constructo Δ PP1 α en comparación con las células en las que se introdujo el constructo WT-ERAP1 (Fig. 29B). Posteriormente, péptido negativo dominante de ERAP1 permeable a la membrana celular (ERAP1/PP1 α -péptido) que tiene el motivo de unión PP1 α se sintetizó, y fueron examinados los factores que influyen en la interacción de ERAP1-PP1 α cuando se introduce en células MCF-7 y la fosforilación de PHB2/REA inherente (Ser39). Como consecuencia, la inhibición dependiente de E2 de la unión de ERAP1-PP1 α mediante la administración del péptido negativo dominante de ERAP1 permeable a la membrana celular se confirmó, y aún más notable la fosforilación de PHB2/REA inherente (Ser39) fue reconocida cuando se introdujo este péptido negativo dominante, (figura 29C). De los resultados anteriores se reveló que la inhibición de la unión de ERAP1 a PP1 α inducía la fosforilación dependiente de E2 del PHB2/REA inherente (S39).

Influencia de la fosforilación de ERAP1 sobre la actividad de fosfatasa PP1 α

A continuación, se investigó la relación entre ERAP1 y la actividad fosfatasa de PP1 α . La actividad de la fosfatasa se examinó cuando la expresión de ERAP1 o PP1 α fue suprimida por el método de siRNA, respectivamente, en células MCF-7. Por lo tanto, se confirmó que la actividad de fosfatasa aumentaba notablemente en las células en las que la expresión ERAP1 era suprimida (Fig. 30A). Posteriormente, con el fin de verificar este efecto de inhibición de la actividad de fosfatasa de PP1 α por ERAP1, se examinó la influencia de la expresión excesiva de ERAP1 en la actividad de fosfatasa PP1 α . Células HEK293T fueron transfectadas con el constructo ERAP1 (0,5, 1,0, 2,0 g) y el

constructo ERAP1 (Δ PP1 α : 2,0 g) en el que se había eliminado la región de unión de PP1 α . Entonces, después de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-PP1 α , se examinó la actividad de fosfatasa de las células. Como consecuencia, se confirmó que cuando la cantidad de expresión de ERAP1 aumentaba, la actividad de PP1 α disminuía (Fig. 30B). A continuación, se investigó la influencia de la estimulación de estrógenos sobre la actividad de PP1 α . Células MCF-7 se estimularon con E2 10 nM durante 6, 12 y 24 horas, y luego se examinó la actividad de la fosfatasa. Por lo tanto, se confirmó que la actividad de fosfatasa PP1 α se aceleraba con el tratamiento de E2 durante 6 horas (Fig. 30C).

De los resultados anteriores, se reveló que 1) ERAP1 era un regulador negativo que suprimía la actividad de la fosfatasa de PP1 α mediante la unión a PP1 α , y 2) PHB2/REA desfosforilaba la fosforilación de Ser39 mediante la unión a ERAP1 que era una unidad de regulación de PP1 α . Sin embargo, estos resultados son opuestos entre sí. Por lo tanto, con el fin de resolver esta cuestión, los presentes inventores construyeron una hipótesis de que la actividad de inhibición de ERAP1 respecto a la actividad de la fosfatasa de PP1 α era inhibida por la estimulación E2. A saber, los presentes inventores se centraron primero en la fosforilación de ERAP1 por la estimulación de E2. Células MCF-7, que eran líneas celulares que expresaban altamente ERAP1, se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas y, a continuación, se realizó el análisis de inmunotransferencia utilizando cada anticuerpo anti-fosforilación. Como consecuencia, se encontró que ERAP1 se fosforilaba en los residuos de serina, treonina y tirosina de manera dependiente de E2 (Fig. 30D). Como se describió anteriormente se sugirió la posibilidad de que ERAP1 podría ser fosforilado por la estimulación de E2 y, como consecuencia, la función de la supresión de PP1 α de la actividad de la fosfatasa podría ser suprimida, para acelerar la actividad de la fosfatasa de PP1 α .

Estudio de la regulación de la fosforilación de PHB2/REA (S39) por la fosforilación de ERAP1 por PKA y PKB a través de la actividad de PP1 α

Posteriormente se investigó la fosforilación de la quinasa ERAP1. Se informó de que las moléculas de la familia ERAP1, es decir, BIG1 y BIG2 forman un complejo con PKA y la fosfatasa de proteína, para funcionar como una de las proteínas AKAP (Proc Natl Acad Sci USA 2003 18 de febrero; 100 (4): 1627- 32. Proc Natl Acad Sci USA 2006 Feb 21; 103 (8): 2683-8. Genes to Cells 11, 949-959, 2006; Journal of Biological Chemistry 283, 2536-25371; Proc Natl Acad Sci USA 2007 Feb 27; 104 (9): 3201-6; Proc Natl Acad Sci USA 2009 Abr 14; 106 (15): 6158-63). A partir de este hecho, se consideró la posibilidad de que ERAP1 también podría funcionar de manera similar como una proteína AKAP similar. De acuerdo con ello, la unión de ERAP1 y PKA se investigó. Células MCF-7 se estimularon con E2 10 nM durante 24 horas. Entonces, se examinó la unión con inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-ERAP1. Como consecuencia, la unión de ERAP1 inherente y PKA inherente fue reconocida (Fig. 30E). Además, PKB, que había sido identificado para la unión en muchas proteínas AKAP, se investigó de manera similar. Como consecuencia, la unión de ERAP1 inherente y PKB inherente también fue confirmada (Fig. 30E). A continuación, se examinó la influencia sobre la actividad de la fosfatasa PP1 α cuando se suprimían las expresiones de PKA y PKB, respectivamente por el método de siRNA. Por lo tanto, se confirmó que la aceleración de la actividad de la fosfatasa dependiente de E2 se suprimía significativamente (Fig. 31A). Posteriormente, se investigó el estado de fosforilación de ERAP1 y PHB2/REA. En las células transfectadas con siEGFP como control, se reconoció la fosforilación de los residuos de serina y treonina de ERAP1 por el tratamiento con E2. Además, en las células tratadas con el péptido ERAP1, se reconoció la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA. Por otra parte, en células suprimidas para la expresión de PKA, se reconoció que la fosforilación del residuo de serina de ERAP1 desaparecía independientemente de la presencia o ausencia de tratamiento con el péptido ERAP1. Además, la fosforilación de ser39 de PHB2/REA después del tratamiento con E2 también se confirmó (Fig. 31 B). Además, en las células suprimidas para la expresión de PKB, el cambio de la fosforilación del residuo de serina de ERAP1 no fue reconocido. Por otro lado, para el residuo de treonina, se reconoció una notable disminución de la fosforilación. Por otra parte, la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA se mostró que se recuperaba por el tratamiento con E2, mientras que las fosforilaciones de la serina y treonina de ERAP1 no fueron casi influenciadas (Fig. 31B). Entonces, también se investigó la influencia de la inhibición de la actividad de PKA por el compuesto H-89 del inhibidor de PKA sobre la fosforilación de ERAP1 y PHB2/REA. Células MCF-7 fueron tratadas con H-89, y luego se examinó la fosforilación de ERAP1 y PHB2/REA. Como consecuencia, se reconoció que las fosforilaciones de los residuos de serina y tirosina de ERAP1 disminuyeron notablemente a 0,5 μ M, y que la fosforilación del residuo de treonina también se redujo de manera dependiente de la dosis (Fig. 31C). Por el contrario, en las células sin tratamiento de H-89, la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA fue reconocida sólo cuando las células se trataron con el péptido ERAP1. Por otro lado, fue reconocida una notable recuperación en células que fueron estimuladas por E2 y que se trataron con H-89 (Fig. 31C). Muy destacadamente, se reconoció que cuando la unión de ERAP1 y PHB2/REA era inhibida por la administración del péptido ERAP1, la fosforilación de Ser39 disminuía dependiendo de la dosis de H-89, y en particular la fosforilación desaparecía por completo en células tratadas con H-89 20 μ M (Fig. 31 C). Este resultado muestra la posibilidad de la inhibición de la fosforilación no específica de H-89.

A continuación, con el fin de investigar la especificidad de la inhibición de PKA, se realizó la comparación entre las influencias de la supresión para la expresión específica de PKA de siRNA y el tratamiento con H-89 sobre la fosforilación de serina de ERAP1 y la fosforilación de PHB2/REA (S39). Células MCF-7 suprimidas para la expresión de PKA mediante el método de siRNA, y MCF-7 tratadas con H-89, se utilizaron en la investigación. Como consecuencia de ello, la fosforilación del residuo de serina de ERAP1 no se reconoció en absoluto en las células transfectadas con siPKA, independientemente de la presencia o ausencia de la estimulación con E2. Por otro lado,

en las células tratadas con H-89, se detectó la recuperación de la fosforilación de ERAP1 después del tratamiento con E2 a baja concentración, mientras que cuando la dosis de H-89 aumentaba, se confirmaba la desaparición de la fosforilación (Fig. 31D). Además, se reconoció en las células tratadas con siPKA que la fosforilación de PHB2/REA se recuperaba cuando las células eran tratadas con E2. Por el contrario, en las células tratadas con H-89, la recuperación de la fosforilación se confirmó como en las células tratadas con siPKA, cuando la concentración de H-89 era baja, pero cuando la dosis de H-89 aumentaba, la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA también disminuía (Fig. 31D). Se ha mostrado hasta ahora que H-89 también actúa sobre otras quinasas distintas a PKA (Science signaling 1, re4, 2008), y estos resultados también sugieren una posibilidad de inhibición no específica de quinasas distintas a PKA. Entonces, se examinaron las influencias del tratamiento del inhibidor de PP1 α , ácido okadaico en la fosforilación de PHB2/REA y la fosforilación de Akt y MAPK. Con respecto a la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA en las células MCF-7, se reconoció que la fosforilación de PHB2/REA dependiente de E2 era recuperada cuando las células se trataron con valor de IC50 de PP1 α , es decir, 20 nM de ácido okadaico, pero la fosforilación se confirmó que disminuía con 40 nM (Fig. 31E). Este fenómeno también sugiere la posibilidad de que el ácido okadaico podría inhibir de forma no específica la actividad además de PP1 α .

A continuación, se trató la identificación de una quinasa fosforilante de PHB2/REA. El experimento descrito a continuación se realizó utilizando PKC α como candidato como quinasa fosforilante de PHB2/REA a partir de los resultados descritos anteriormente de que la desaparición de la fosforilación de PHB2/REA por tratamiento con ácido okadaico 40 nM fue confirmada; y se mostró que el ácido okadaico inhibía la actividad de PKC; además la secuencia en la proximidad de Ser39 de PHB2/REA fue altamente conservada también para PKA y PKC α ; y PKC α es altamente expresado en el cáncer de mama. Células MCF-7 suprimidas para la expresión de PKC α por el método de siRNA fueron tratadas con E2 y el péptido ERAP1, y luego se fraccionaron en las fracciones del citoplasma y nucleares. A continuación, se realizó el análisis de inmunotransferencia de cada fracción. Como consecuencia, se reconoció que la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA disminuía notablemente en el núcleo y el citoplasma de las células tratadas con E2 y el péptido ERAP1 (Fig. 31F). De lo descrito anteriormente se sugirió la posibilidad de que PKC α podía fosforilar a REA (S39). De los resultados anteriores se sugirió que PKA fosforilaba el residuo de serina de ERAP1, y como consecuencia, se aceleró la actividad de fosfatasa de PP1 α , y por lo tanto Ser39 de la unión de PHB2/REA al complejo PP1 α -ERAP1 se desfosforiló.

Estudio de si PP1 α es un gen diana del RE o no

Basado en el hecho de que PP1 α tiene funciones como unidad de catalizador de ERAP1, los presentes inventores construyeron una hipótesis de que PP1 α podía ser también uno de los genes diana de RE α como ERAP1 en células de cáncer de mama, y se realizó el experimento descrito a continuación. Líneas celulares positivas para ER, es decir, células MCF-7, células ZR-75-1, células T47D y células BT-474 se estimularon con E2 durante 24 horas, y luego el nivel de proteína y el nivel de expresión ARNm de PP1 α se examinaron con Western Blot y PCR a tiempo real (Fig. 32A, B). Como consecuencia se reconoció que la expresión de PP1 α se aceleraba de manera dependiente de E2 en todas las líneas celulares, tanto en el nivel de proteína (Fig. 32A) como en el nivel del ARNm (Fig. 32B). Entonces, si ERE o no (elemento responsable de estrógenos, secuencia responsable de E2: AGGTCAnnnTGACCT) estaba presente en el gen PP1 α (PPP1CA), fue buscado mediante el software de Genomatix (Genomatix Software, Munich, Alemania). Como consecuencia, las secuencias ERE conservadas se confirmaron en 3 puntos (Fig. 32C). Entonces, fue examinado si RE α se unía o no directamente a esta secuencia de ERE estimado con el método de inmunoprecipitación de la cromatina (método ChIP) usando el anticuerpo de RE α . Como consecuencia, la unión fue reconocida en una región que comprendía desde el punto de inicio de la traducción (-726) a -704 y una región que comprendía desde +1936 hasta +1959 (Fig. 32D), pero la unión no fue reconocida en una región +1851 hasta +1873 (Fig. 32D). El constructo 5'-ERE que comprende esta región estimada que comprende -726 a -704, y una construcción del vector de expresión que consiste en 5'-ERE y en tándem de la región de desde +1936 hasta +1959 (5'-ERE y el intrón 2 ERE) fueron fabricados, respectivamente, y la actividad del indicador de luciferasa se examinó (Fig. 32E). Como consecuencia, en las células en las que se introdujo el constructo 5'-ERE, se reconoció que la actividad de luciferasa se aceleraba 3 veces en comparación con el control, y además en 5'-ERE y el constructo intrón 2 ERE, se reconoció que la actividad del indicador de luciferasa se aceleraba 5 veces. De lo descrito anteriormente se sugirió que PP1 α podía ser uno de los genes diana de RE α como ERAP1, y ser regulado por un mecanismo de retroalimentación positiva en el que si se inducía la activación de RE α de una manera dependiente de E2, la expresión de la misma se aceleraba.

Influencia del tratamiento con el péptido ERAP1 en la aceleración de la expresión de proteína y génica por la estimulación de estrógenos

De los resultados hasta el momento se demostró que el péptido ERAP1 suprimía la ruta de activación genómica de RE dependiente de E2 y la ruta de activación no genómica en células positivas para RE. Sin embargo, sólo la influencia en la conocida ruta de activación de RE ha sido estudiada hasta ahora, pero no estaba claro qué expresión de gen o proteína estaba influenciada por el genoma ampliamente. En consecuencia, fueron examinadas las expresiones de ARNm y proteicas en células MCF-7 después de ser administrado E2 y el péptido ERAP1 con el análisis de microarrays/proteoma. Células MCF-7 fueron tratadas con el péptido ERAP1 o el péptido ERAP1-codificado (Péptido scr), y se recogieron las células después de 1 hora de tratamiento, y se pusieron a disposición del experimento. Como consecuencia, de manera notable, se reconoció que muchas proteínas (Fig. 33A) y ARNm

5 (Fig. 33B) disminuían significativamente, y el genoma ampliamente por la administración del péptido ERAP1, en comparación con el cambio de las expresiones cuando se administraba E2 o E2+ péptido ERAP1-codificado. Además, como se muestra en la Tabla 1, se encontró que las expresiones de muchos genes no mostrados hasta la fecha, incluyendo genes de respuesta de estrógeno conocidos y genes diana RE, fueron suprimidas simplemente 1 hora después del tratamiento con el péptido ERAP1, y que las funciones de estos genes fueron de amplio espectro (Tablas 1 y 2). De los resultados anteriores, se encontró que la administración del péptido ERAP1, que podía inducir la función de supresión de PHB2/REA, suprimía las rutas de señal E2 desconocidas, además de la conocida ruta de señal E2.

[Tabla 1]

Gen dependiente de estrógenos, cuya expresión es suprimida por el tratamiento con el péptido ERAP1											
Ref. seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio	Ref.seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio	Ref. seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio	Ref.seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio
NM_020169	LXN	11.09	NM_001353	AKR1C1	7.79	N.002395	ME1	6.91	NM_133374	ZNF618	6.39
NM_020311	CXCR7	10.15	NM_018479	ECHDC1	7.73	NM_004363	CEACAM5	6.84	NM_001444	FABP5	6.38
NM_000067	CA2	9.87	NM_021073	BMP5	7.72	NM_00132	CTNND2	6.83	NM_003739	AKR1C3	6.37
XM_003119804	LOC100508679	9.85	NM_207355	POTEB	7.70	NM_006528	TFPI2	6.82	NM_004816	FAM189A2	6.33
NM_000101	CYBA	9.51	NM_032756	HPDL	7.68	NM_174981	POTED	6.82	NM_032883	TOX2	6.29
NM_033512	TSPYL5	9.50	NM_003290	TPM4	7.60	NM_030801	MAGED4B	6.80	NM_014646	LPIN2	6.27
NM_006806	BTG3	9.06	NM_001080506	TMEM150C	7.57	NM_173556	CCDC83	6.76	NM_173515	CNKSR3	6.27
NM_173551	ANKS6	9.00	NM_003506	FZD6	7.54	NM_003881	WISP2	6.73	NM_058173	MUCL1	6.13
NM_002402	MEST	8.84	NM_031935	HMCN1	7.54	NM_020672	S100A14	6.73	NM_001740	CALB2	6.05
NM_007231	SLC6A14	8.73	NM_001039966	GPFR	7.51	NR_015377	LOC654433	6.72	NM_005434	MALL	6.05
NM_015916	CALHM2	8.63	NM_015976	SNX7	7.48	NM_013453	SPANXA1	6.68	NM_001818	AKR1C4	6.00
NM_018665	DDX43	8.53	NM_001753	CAV1	7.44	NM_144586	LYPD1	6.66	NM_00101964	KLK6	5.98
NR_001564	XIST	8.53	NM_138711	PPARG	7.30	NM_178505	TMEM26	6.66	NM_000361	THBD	5.97
NM_144584	C1 or f59	8.43	NR_026869	NCRNA00052	7.27	NM_001233	CAV2	6.63	NM_138441	C6orf150	5.95
NM_001719	BMP7	8.40	NM_005856	RAMP3	7.25	NM_019076	UGT1A8	6.60	NM_000304	PMP22	5.93

Gen dependiente de estrógenos, cuya expresión es suprimida por el tratamiento con el péptido ERAP1											
Ref. seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio	Ref.seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio	Ref. seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio	Ref.seq	Símbolo del gen	Nivel de cambio
NM_001008539	SLC7A2	8.32	NM_015668	RGS22	7.22	NM_020436	SALL4	6.60	NM_021116	ADCY1	5.92
NM_002239	KCNJ3	8.31	NM_001145077	LRRC10B	7.17	NR_002728	KCNQ1OT1	6.60	NM_017679	BCAS3	5.92
NM_144947	KLK11	8.08	NM_017770	ELOVL2	7.14	NM_001080507	OOEP	6.57	NM_000624	SERPINA5	5.87
NM_006317	BASP1	8.01	NM_004321	KIF1A	7.12	NM_001010853	PM20D2	6.56	NM_005855	RAMP1	5.82
NM_145168	SDR42E1	8.01	NR_003245	HAR1B	7.11	NM_145664	SPANXB2	6.55	NM_025113	C13orf18	5.79
NM_001017372	SLC27A6	8.00	AK092688	LOC732272	7.09	NR_024418	LOC389332	6.52	NM_001072	UGT1A6	5.78
NM_000853	GSTT1	7.93	NM_144967	ARHGAP36	7.08	NM_005634	SOX3	6.52	NM_020815	PCDH10	5.78
NM_207308	NUP210L	7.84	NM_1446 01	CMTM3	7.06	NM_001008495	TMEM64	6.46	NM_006207	PDGFR	5.77
NM_004586	RPS6KA3	7.84	NM_005668	ST8SIA4	6.99	NM_004982	KCNJ8	6.44	NM_020134	DPYSL5	5.76
NM_004734	DCLK1	7.84	NM_002356	MARCKS	6.99	NM_017422	CALML5	6.39	NM_003264	TLR2	5.74
Nivel de cambio: nivel de expresión del gen con la estimulación de E2 solo/ nivel de expresión del gen con la estimulación de E2 + tratamiento con el péptido											

La Tabla 1 muestra los genes dependientes de estrógenos de los cuales la expresión fue suprimida por el tratamiento con el péptido ERAP1. Se enumeran los 100 genes principales cuya expresión fue fuertemente acelerada por la estimulación de estrógenos en comparación con los de 0 horas, y que fue suprimida por el péptido ERAP1.

- 5 [Tabla 2] Análisis GO del gen dependiente de estrógenos cuya expresión se suprimió por el tratamiento con el péptido ERAP1

Término GO	Valor P	Término GO	Valor P
Respuesta a estímulos de estrógenos	0,001	Respuesta a fármacos	0,013
Respuesta a estímulos hormonales	0,002	Respuesta a estímulos extracelulares	0,018
Respuesta a sustancias orgánicas	0,002	Transporte de ácido monocarboxílico	0,019
Homeostasis de los lípidos	0,002	Regulación del tamaño del vaso sanguíneo	0,023
Regulación de la ruta de señalización de la proteína del receptor acoplada a proteína G	0,002	Regulación del tamaño del tubo	0,025
Respuesta al estímulo de la hormona esteroide	0,002	Respuesta a estímulos abióticos	0,025
Respuesta a estímulos endógenos	0,003	Proceso vascular en el sistema circulatorio	0,028
Respuesta a nutrientes	0,004	Transporte de lípidos	0,030
Transporte de ácidos carboxílicos	0,005	Organización de balsas de la membrana	0,030
Transporte de ácidos orgánicos	0,005	Polimerización de microtúbulos	0,032
Regulación negativa de la proliferación celular	0,007	Localización de lípidos	0,037
Formación de balsas de membrana	0,009	Respuesta a vitaminas	0,037
Circulación sanguínea	0,011	Ensamblaje del complejo de proteína celular	0,038
Proceso del sistema circulatorio	0,011	Transporte de ácidos biliares y la sal de bilis	0,040
Respuesta a niveles de nutrientes	0,013	Regulación positiva de la ruta de señalización de la proteína receptora acoplada a la proteína G	0,046
Homeostasis de esteroides	0,013		

- 10 La Tabla 2 muestra el análisis GO del gen dependiente de estrógenos cuya expresión fue suprimida por el tratamiento con el péptido ERAP1. El gen cuya expresión se vio fuertemente acelerada por la estimulación de estrógenos en comparación con los de 0 horas, y suprimida por el péptido ERAP1, se sometió a análisis GO. Los datos fueron tratados estadísticamente con la prueba exacta de Fisher.

Estudio de la unión específica del péptido ERAP1 a PHB2/REA

- 15 Se demostró en el Ejemplo 1 que el péptido ERAP1 se une específicamente a PHB2/REA, y en este ejemplo, se obtuvo el valor de K_d (la constante de velocidad de disociación) como un índice bioquímico para la interacción de los dos. En primer lugar, fue examinada la unión del péptido ERAP1 y PHB2/REA por Biacore. La proteína PHB2/REA recombinante marcada con 6xHis se inmovilizó sobre un chip sensor. Entonces, el péptido ERAP1 marcado con HA a las concentraciones mostradas en la Fig. 34A se hizo reaccionar y, a continuación el valor de K_d se calculó a partir de la curva del sensograma. Como consecuencia, el valor de K_d del péptido ERAP1 fue 18,9 μ M (Fig. 34A).
- 20 Entonces, el valor de K_d de PHB2/REA se midió por el método de espectroscopia por correlación de fluorescencia. Se hicieron reaccionar el péptido ERAP1 marcados con FITC 10 nM, el péptido ERAP1-codificado FITC-marcado (Péptido scr), y la proteína PHB2/REA recombinante 6xHis-marcado durante 1 hora, y luego se midió la fluorescencia FITC. Como consecuencia, el valor de K_d de la proteína recombinante PHB2/REA fue de 14,4 μ M (Fig. 34B).

Fabricación del anticuerpo monoclonal anti-ERAP1

Se realizó la fabricación del anticuerpo monoclonal anti-ERAP1. En primer lugar, se realizó la confirmación de la especificidad del anticuerpo monoclonal purificado anti-ERAP1. Con el uso de células MCF-7 suprimidas para la expresión de ERAP1 por el método de siRNA, se realizó el análisis de inmunotransferencia con anticuerpo purificado anti-ERAP1. Como consecuencia, el anticuerpo anti-ERAP1 purificado no fue reconocido para la banda no específica, y se detectó la banda ERAP1-específica (Fig. 35A). Posteriormente, se examinó si el anticuerpo purificado anti-ERAP1 podía ser inmunoprecipitado o no. Los lisados de células MCF-7 (M) y células T47D (T) se inmunoprecipitaron con el anticuerpo purificado anti-ERAP1, y la coprecipitación de la proteína de unión PHB2/REA fue reconocida (Fig. 35B). De lo descrito anteriormente se encontró que el anticuerpo monoclonal anti-ERAP1 establecido esta vez podía reconocer a ERAP1 específicamente, y ser inmunoprecipitado.

Construcción del anticuerpo de PHB2/REA (S39) anti-fosforilación

Se realizó la fabricación de anticuerpo policlonal que reconoce específicamente a Ser39 de PHB2/REA. La línea celular de cáncer de mama MCF-7 positiva para ER se trató con E2, y sólo cuando se administró el péptido ERAP1, se detectó la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA por el anticuerpo fabricado anti-fosforilación PHB2/REA (S39) (Fig. 36). De los resultados anteriores se sugirió que la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA se desfosforiló cuando PHB2/REA se unía a ERAP1, y la unión de PHB2/REA y ERAP1 fue inhibida por el péptido ERAP1, y cuando PHB2/REA fue liberado de ERAP1, PHB2/REA fue fosforilado en Ser39.

La estabilidad del péptido ERAP1 y su influencia en el E2 celular

Se investigaron la estabilidad del péptido ERAP1 y su influencia en el E2 celular. En primer lugar, células MCF-7 fueron tratadas con E2 y el péptido ERAP1 HA-marcado, y luego se llevó a cabo el análisis de inmunotransferencia. Como consecuencia se encontró que el porcentaje residual del péptido ERAP1 era del 84%, en promedio, 24 horas después de la administración, y 56%, 58% y 54% después de 30, 36 y 48 horas, respectivamente, y la semivida del péptido ERAP1 era generalmente de aproximadamente 30 horas (Fig. 37A). A continuación, se investigó la influencia del péptido ERAP1 en la concentración de E2 celular. Células MCF-7 fueron tratadas con E2 10 nM y el péptido ERAP1 10 μ M, y luego se recogió el lisado celular temporalmente, y se midió la concentración de E2 celular. Como consecuencia, un valor máximo de aproximadamente 10 nM se muestra a las 6 horas después de la administración, que disminuyó a aproximadamente 80% después de 48 horas (Fig. 37B).

Participación de aminoácidos particulares de ERAP1 en la unión a PHB2/REA

Se mostró en el Ejemplo 1 que tres aminoácidos, es decir, Q165, D169 y Q173 de ERAP1 eran importantes para la unión a PHB2/REA. Por lo tanto, se investigó qué aminoácido de entre estos tres aminoácidos era el más importante para la unión. Células COS-7 fueron transfectadas con cualquiera del constructo PHB2/REA y ERAP1-WT tipo normal (1-434 aa), un mutante de alanina de Q165, D169 y Q173 (mutante), un mutante de alanina de Q165 (Q165A), un mutante de alanina de D169 (D169A), un mutante de alanina de Q173 (Q173A), y un mutante de alanina de Q165 y D169 (Q165A, D169A). Luego, después de 48 horas, se recogieron las células, y se realizaron la inmunoprecipitación y el análisis de inmunotransferencia. Como consecuencia, la más alta inhibición de la unión a PHB2/REA fue reconocida en el experimento usando el constructo mutante D169 (22% con IP de anticuerpo anti-FLAG, y 0% con IP de anticuerpo anti-HA). Además, la siguiente inhibición de la unión más alta fue reconocida cuando se utilizó el constructo mutante Q165 (60% con IP de anticuerpo anti-FLAG, 24% con IP de anticuerpo anti-HA) (Fig. 38A). Posteriormente, con el fin de verificar estos resultados, se realizó un experimento similar con el mutante de alanina de Q165 y D169 (Q165A, D169A). Por lo tanto, el grado equivalente de la inhibición de la unión se confirmó en comparación con el caso en el que se utilizó una construcción en la que todos los aminoácidos se mutaron con Ala, (Mutante: Q165A, D169A = 2%: 12%) (Fig. 38B). De lo descrito anteriormente se encontró que el rango de los aminoácidos que eran importantes para la unión a PHB2/REA entre estos 3 aminoácidos era D169> Q165> Q173 y Q165 y D169 ocuparon el 90% de esta unión.

Influencia de la fosforilación de ERAP1 por PKA y PKB en la fosforilación de PHB2/REA (S39) a través de la regulación de la actividad de PP1 α (células KPL-3C)

A continuación, en la misma forma que las células MCF-7 descritas anteriormente, los estados de fosforilación de ERAP1 y PHB2/REA se investigaron en la línea de células de cáncer de mama KPL-3C positiva para ER. Primero, las células KPL-3C, en las que la expresión de ERAP1 o PP1 α era suprimida por siRNA, se estimularon con E2 durante 24 horas, y luego ERAP1 y PHB2/REA se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-ERAP1 o anticuerpo anti-PHB2/REA. Además, con respecto a la muestra obtenida, se realizó el análisis de inmunotransferencia. En las células transfectadas con ARNs de control, la fosforilación de la serina y la treonina de ERAP1 por tratamiento con E2, y la desfosforilación de Ser39 de PHB2/REA fueron reconocidas. Sin embargo, en las células suprimidas para la expresión de PP1 α , ERAP1 no tuvo ninguna influencia sobre la fosforilación de la serina y la treonina, pero la recuperación de la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA se confirmó después del tratamiento con E2 (Fig. 39A). Luego, con células KPL-3C suprimidas para la expresión de PKA con siRNA, la desaparición de la fosforilación del residuo de serina de ERAP1 fue reconocida, pero también la recuperación de la fosforilación del residuo de serina de Ser39 de PHB2/REA fue reconocida (Fig. 39B). Por otro lado, cuando se suprimió la expresión de PKB, no se

reconoció la influencia sobre la fosforilación del residuo de serina o el residuo de treonina de ERAP1. Por otro lado, la recuperación de la fosforilación de Ser39 de PHB2/REA fue reconocida en la misma forma que la supresión de la expresión de PKA (Fig. 39B). Posteriormente, en las células KPL-3C, también se investigó la influencia de la supresión de la expresión de PP1 α , PKA, PKB o ERAP1 por siRNA en la actividad de la fosfatasa de PP1 α . Como consecuencia, se confirmó que si la expresión de ERAP1 era suprimida, la actividad fosfatasa de PP1 α se aceleraba independientemente de la presencia o ausencia de E2. Por otra parte, se reconoció que si se suprimían las expresiones de PP1 α , PKA y PKB, respectivamente, la actividad de la fosfatasa de PP1 α disminuía. De los resultados anteriores se sugirió que también en la línea celular de cáncer de mama positivo para RE KPL-3C, ERAP1 promovía la aceleración de la actividad de la fosfatasa de PP1 α a través de la fosforilación del residuo de serina por PKA en la misma forma que las células MCF-7 y, como consecuencia, causaba la desfosforilación de Ser39 de PHB2/REA.

Supresión de la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama negativas para RE α por el péptido ERAP1

Se investigó el efecto de supresión de la proliferación del péptido ERAP1 en líneas celulares de cáncer de mama negativas para RE α . Las líneas celulares de cáncer de mama negativas para RE α , las células SK-BR-3, fueron tratadas con el péptido ERAP1 o el péptido ERAP1-codificado (Péptido scr). A las 24 horas y 48 horas después del tratamiento, se examinó la influencia sobre la proliferación celular. Como consecuencia se reconoció que el péptido ERAP1 tenía un efecto de supresión de la proliferación celular de manera dependiente de la dosis tanto a las 24 horas como a las 48 horas después del tratamiento, aunque el grado del efecto fue menor en comparación con el efecto de supresión del péptido ERAP1 en líneas celulares positivas para ER (Fig. 40). A partir de lo descrito anteriormente, se reconoció que péptido ERAP1 tenía un efecto de supresión de la proliferación también en el cáncer de mama negativo para RE y positivo para ERAP1.

Estudio de la producción de ROS en las mitocondrias inducida por la estimulación de E2 a través ERAP1

Se realizó una investigación para la localización de ERAP1 en las líneas celulares de cáncer de mama positivas para ER, células MCF-7. En el Ejemplo 1, se demostró que ERAP1 inherente en las células de cáncer de mama se localizaba principalmente en el citoplasma, pero una localización en las mitocondrias también fue reconocida. Además, PHB2/REA, que es la proteína de unión de ERAP1, también se reconoce que se localiza en las mitocondrias. Por lo tanto, los presentes inventores se centraron en las funciones de ERAP1 en la mitocondria. En primer lugar, se investigaron las localizaciones de ERAP1 y PHB2/REA. Células MCF-7 fueron tratadas con E2 y el péptido ERAP1. A continuación, las células se centrifugaron por gravedad específica para fraccionar en la fracción de mitocondrias (M), la fracción de citoplasma (C) y la fracción nuclear (N). A continuación, se realizó el análisis de inmunotransferencia de cada fracción. Como consecuencia, se reconoció una alta localización de ERAP1 en las fracciones del citoplasma y de las mitocondrias. Por otra parte, se encontró que PHB2/REA también se localizaba de manera similar en las mitocondrias, y se translocaba al núcleo cuando el péptido ERAP1 se administraba (Fig. 41A). Posteriormente, con la consideración de los papeles de ERAP1 y PHB2/REA en las mitocondrias, se investigó la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) en las mitocondrias a través de ERAP1. Células MCF-7, células MCF-7 en las que se suprimió la expresión de ERAP1, y células HCC1395 fueron tratadas con DHR123 durante 15 minutos, y después se estimularon con el péptido ERAP1 10 μ M y E2 durante 24 horas, y se analizaron por citometría de flujo. Como consecuencia, se observó en las células MCF-7 que la generación de ROS era notablemente suprimida por la administración del péptido ERAP1 en las células transfectadas con ARNsi de control. Sin embargo, se reconoció en las células en las que se suprimió la expresión de ERAP1 que la administración del péptido ERAP1 no tuvo influencia en la generación de ROS. Además, la observación se realizó mediante líneas de cáncer de mama de células ER-positivo/ERAP1-negativo (células HCC1395) como control positivo. Sin embargo, no hubo ninguna detección significativa (Fig. 41B). Como se describió anteriormente, se sugirió que la producción de ROS en las mitocondrias por la estimulación de E2 en las mitocondrias de las células de cáncer de mama era inducida a través de ERAP1, y suprimida por el péptido ERAP1.

Aplicabilidad industrial

El péptido ERAP1 proporcionado por la presente invención es útil para el tratamiento del cáncer. Más específicamente, el péptido de la presente invención se puede esperar que tenga efectos terapéuticos por nuevos mecanismos en los cánceres que sean positivos para el receptor de estrógeno, y en el que se exprese el polipéptido ERAP1. El péptido ERAP1 de la presente invención está especialmente dirigido a ERAP1, que es una proteína que se expresa altamente y específicamente en el cáncer positivo para receptores de estrógeno. Por lo tanto, se espera que el péptido de la presente invención tenga leves efectos secundarios. Además, se espera que el péptido de la presente invención tenga efectos terapéuticos también en el cáncer de mama resistente al tamoxifeno. Además, el péptido ERAP1 de la presente invención por sí mismo suprime la proliferación de células cancerosas, y además, tiene acciones de potenciar los efectos terapéuticos de los agentes de terapia hormonal o agentes de quimioterapia. Por lo tanto, el péptido ERAP1 de la presente invención se puede utilizar en combinación con otros agentes de terapia hormonal o agentes de quimioterapia, y por lo tanto se espera que proporcione un tratamiento más eficaz del cáncer. La presente descripción también puede proporcionar un método de detección de un fármaco candidato para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que utiliza la inhibición de la unión del polipéptido ERAP1 al polipéptido PP1 α , polipéptido PKA, o polipéptido PKB como un índice, para contribuir al desarrollo de una nueva estrategia de tratamiento del cáncer.

Listado de secuencias

<110> The University of Tokushima
OncoTherapy Science, Inc.

<120> Péptidos derivados de ERAP1 y uso de los mismos

5 <130> ONC-A1109P

<150> JP2011-167171

<151> 2011-07-29

<160> 86

<170> PatentIn version 3.4

10 <210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Un cebador para RT-PCR

<400> 1

gcagggagag gagtttgtgt g 21

<210> 2

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un cebador para RT-PCR

<400> 2

25 tgggagagga tgaggaggag 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Un cebador para RT-PCR

<400> 3

gagtgatag cattgcttgc g 21

<210> 4

35 <211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un cebador para RT-PCR

40 <400> 4

caagtcagtg tacaggtaag c 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un cebador para PCR a tiempo real

<400> 5

ggcctcctta ggcaaatgtt 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real
 <400> 6
 cctcctctct gtcctcaaagg 20
 10 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real
 15 <400> 7
 cagaagtgcg aggaggaggt 20
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real
 <400> 8
 cggatggagt tgtcgggtg 19
 25 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Un cebador para PCR a tiempo real
 <400> 9
 cgtctccaca catcagcaca 20
 <210> 10
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real
 <400> 10
 40 gctccgtttt agctcgttcc 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real
 <400> 11
 tgctgctcaa ctctctcca 20
 50 <210> 12
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 5 <400> 12
 gcatctgggc tgtttctcc 20

 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 13
 taccccaact cccttacc 20

 15 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 14
 cccactcacc tctccatct 20

 <210> 15
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 15
 30 ccccgagta ggagacgaga 20

 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 16
 gcagaggag gagaaagtg 20

 <210> 17
 40 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 45 <400> 17
 cttgacaagg ctttggagt 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 18
 caatatgctt ttcccgcttt 20

 5 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 19
 ggatctgctt ctccagtttt 20

 <210> 20
 <211> 20
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 20
 20 actgagaaat cacgcactgt 20

 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 21
 aacttagagg tggggagcag 20

 <210> 22
 30 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 35 <400> 22
 cacaaccatg ccttacttta tc 22

 <210> 23
 <211> 26
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR

 <400> 23
 ggggtacctt atatcactag tcgaca 26

 45 <210> 24
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Un cebador para PCR

<400> 24
 ccgctcgaga gaactagagc agacaa 26

 <210> 25
 <211> 15
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(9)
 10 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 25
 aggtcannnt gacct 15

 <210> 26
 <211> 17
 15 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 26
 tccagttgca ttgacct 17

 <210> 27
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido negativo dominante ERAP1

 25 <400> 27
 Gln Met Leu Ser Asp Leu Thr Leu Gln Leu Arg Gln Arg
 1 5 10

 <210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido ERAP1 con secuencia permutada

 <400> 28
 Asp Arg Gln Leu Gln Leu Ser Thr Leu Gln Arg Met Leu
 1 5 10

 35 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> péptido mutante de ERAP1

 <400> 29
 Ala Met Leu Ser Ala Leu Thr Leu Ala Leu Arg Gln Arg
 1 5 10

 <210> 30
 <211> 13
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido negativo dominante ERAP1

<400> 30
Ala Thr Leu Ser Gln Met Leu Ser Asp Leu Thr Leu Gln
1 5 10

<210> 31
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido negativo dominante ERAP1

<400> 31
Gln Met Leu Ser Asp Leu Thr Leu Gln
10 1 5

<210> 32
<211> 1302
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Fragmento N-terminal de ERAP1 codificante de polinucleótido

<400> 32
atggaagaaa tcctgaggaa gctgcagaag gaggcgtccg ggagcaagta caaagccatc 60
aaggagagct gcacctgggc cctggaaaact ctagggtggc tgataccat tgtcaagatc 120
cctccacatg tactgaggga gaaatgcctg ctgcctctcc agttggcttt ggaatccaag 180
aatgtgaagc tggcccaaca tgctttggca gggatgcaga agcttctgtc ggaagagagg 240
tttgtatcca tggaacaga ttctgatgag aagcagctgc tcaatcagat actgaatgcc 300
gtgaaagtga cgccttcgct caacgaggac ctgcaggtgg aagtgatgaa ggttttacta 360
tgcacacact acacgccaac atttgatctg aatgggagtg ccgtgctgaa gatcgcgag 420
gtgtgcattg agacgtacat aagcagctgt caccagcgta gcataaacac tgctgtgcgg 480
gcaactctca gtcaaagtct gactgacttg actttacagt tacgacagag gcaggagaat 540
acgataattg aaaaccaga tgtccacag gatttcggga atcaagggtc aacagtagag 600
tccctctgtg atgatgttgt ctctgtactc accgtcctgt gtgagaagct gcaagccgcc 660
ataaatgaca gccagcagct gcagcttctc tacctggagt gcatcctgtc tgtgtctcagc 720
agctcctcct cctccatgca cctgcacagg cgcttcacgg acctgatctg gaaaaacctc 780
tgccctgtct tcatcgtgat cttggggaat ccaattcatg acaaaaccat cacctctgct 840
cacaccagca gcaccagtac cagcctggag tcggactctg cgtctccggg agtgtctgac 900
cacggccgag gatcaggctg ctctgcact gcgcgggcc tgagcggacc tgtggctcgg 960
actatctatt acatcgagc cgagctggtc cggctgggtg ggtctgtgga ctccatgaag 1020
cccgtgctcc agtccctcta ccaccgagt ctgctctacc cccacccca gcaccgggtg 1080
gaagccatca aaataatgaa agagatactt gggagccac agcgtctctg tgacttggca 1140
ggaccagct ccaactgaatc agagtccaga aaaagatcaa tttcaaaaag aaagtctcat 1200
ctggatctcc tcaaaactcat catggatggc atgaccgaag catgcatcaa ggggtggcatc 1260
gaagcttgct atgcagccgt gtctgtgtc tgcaccttgc tg 1302

<210> 33
20 <211> 434

ES 2 613 808 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento N-terminal de ERAP1

5 <400> 33
Met Glu Glu Ile Leu Arg Lys Leu Gln Lys Glu Ala Ser Gly Ser Lys
1 5 10 15

Tyr Lys Ala Ile Lys Glu Ser Cys Thr Trp Ala Leu Glu Thr Leu Gly
20 25 30

Gly Leu Asp Thr Ile Val Lys Ile Pro Pro His Val Leu Arg Glu Lys
35 40 45

Cys Leu Leu Pro Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu
50 55 60

Ala Gln His Ala Leu Ala Gly Met Gln Lys Leu Leu Ser Glu Glu Arg
65 70 75 80

Phe Val Ser Met Glu Thr Asp Ser Asp Glu Lys Gln Leu Leu Asn Gln
85 90 95

Ile Leu Asn Ala Val Lys Val Thr Pro Ser Leu Asn Glu Asp Leu Gln
100 105 110

Val Glu Val Met Lys Val Leu Leu Cys Ile Thr Tyr Thr Pro Thr Phe
115 120 125

Asp Leu Asn Gly Ser Ala Val Leu Lys Ile Ala Glu Val Cys Ile Glu
130 135 140

Thr Tyr Ile Ser Ser Cys His Gln Arg Ser Ile Asn Thr Ala Val Arg
145 150 155 160

Ala Thr Leu Ser Gln Met Leu Ser Asp Leu Thr Leu Gln Leu Arg Gln
165 170 175

Arg Gln Glu Asn Thr Ile Ile Glu Asn Pro Asp Val Pro Gln Asp Phe
180 185 190

Gly Asn Gln Gly Ser Thr Val Glu Ser Leu Cys Asp Asp Val Val Ser
195 200 205

Val Leu Thr Val Leu Cys Glu Lys Leu Gln Ala Ala Ile Asn Asp Ser
210 215 220

Gln Gln Leu Gln Leu Leu Tyr Leu Glu Cys Ile Leu Ser Val Leu Ser
225 230 235 240

ES 2 613 808 T3

Ser Ser Ser Ser Ser Met His Leu His Arg Arg Phe Thr Asp Leu Ile
245 250 255

Trp Lys Asn Leu Cys Pro Ala Leu Ile Val Ile Leu Gly Asn Pro Ile
260 265 270

His Asp Lys Thr Ile Thr Ser Ala His Thr Ser Ser Thr Ser Thr Ser
275 280 285

Leu Glu Ser Asp Ser Ala Ser Pro Gly Val Ser Asp His Gly Arg Gly
290 295 300

Ser Gly Cys Ser Cys Thr Ala Pro Ala Leu Ser Gly Pro Val Ala Arg
305 310 315 320

Thr Ile Tyr Tyr Ile Ala Ala Glu Leu Val Arg Leu Val Gly Ser Val
325 330 335

Asp Ser Met Lys Pro Val Leu Gln Ser Leu Tyr His Arg Val Leu Leu
340 345 350

Tyr Pro Pro Pro Gln His Arg Val Glu Ala Ile Lys Ile Met Lys Glu
355 360 365

Ile Leu Gly Ser Pro Gln Arg Leu Cys Asp Leu Ala Gly Pro Ser Ser
370 375 380

Thr Glu Ser Glu Ser Arg Lys Arg Ser Ile Ser Lys Arg Lys Ser His
385 390 395 400

Leu Asp Leu Leu Lys Leu Ile Met Asp Gly Met Thr Glu Ala Cys Ile
405 410 415

Lys Gly Gly Ile Glu Ala Cys Tyr Ala Ala Val Ser Cys Val Cys Thr
420 425 430

Leu Leu

<210> 34

<211> 14852

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (172)..(6705)

ES 2 613 808 T3

<400> 34
gtggcccgcg gcatggagcg ggcgtgattc atcagcatcc gcgccggggc ggcattggggg 60
cgcgcgcggc ggccgcctag gcgccaggg ccaggcagcg gcggcttccc cggcccggt 120
cgcccgcgct tctctccctg tgggcggcgg cccggcgctt ggaaggtaaa g atg gaa 177
Met Glu
1
gaa atc ctg agg aag ctg cag aag gag gcg tcc ggg agc aag tac aaa 225
Glu Ile Leu Arg Lys Leu Gln Lys Glu Ala Ser Gly Ser Lys Tyr Lys
5 10 15
gcc atc aag gag agc tgc acc tgg gcc ctg gaa act cta ggt ggt ctg 273
Ala Ile Lys Glu Ser Cys Thr Trp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Gly Leu
20 25 30
gat acc att gtc aag atc cct cca cat gta ctg agg gag aaa tgc ctg 321
Asp Thr Ile Val Lys Ile Pro Pro His Val Leu Arg Glu Lys Cys Leu
35 40 45 50
ctg cct ctc cag ttg gct ttg gaa tcc aag aat gtg aag ctg gcc caa 369
Leu Pro Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Ala Gln
55 60 65
cat gct ttg gca ggg atg cag aag ctt ctg tcg gaa gag agg ttt gta 417
His Ala Leu Ala Gly Met Gln Lys Leu Leu Ser Glu Glu Arg Phe Val
70 75 80
tcc atg gaa aca gat tct gat gag aag cag ctg ctc aat cag ata ctg 465
Ser Met Glu Thr Asp Ser Asp Glu Lys Gln Leu Leu Asn Gln Ile Leu
85 90 95
aat gcc gtg aaa gtg acg cct tcg ctc aac gag gac ctg cag gtg gaa 513
Asn Ala Val Lys Val Thr Pro Ser Leu Asn Glu Asp Leu Gln Val Glu
100 105 110
gtg atg aag gtt tta cta tgc atc acc tac acg cca aca ttt gat ctg 561
Val Met Lys Val Leu Leu Cys Ile Thr Tyr Thr Pro Thr Phe Asp Leu
115 120 125 130
aat ggg agt gcc gtg ctg aag atc gcg gag gtg tgc att gag acg tac 609
Asn Gly Ser Ala Val Leu Lys Ile Ala Glu Val Cys Ile Glu Thr Tyr
135 140 145
ata agc agc tgt cac cag cgt agc ata aac act gct gtg cgg gca act 657
Ile Ser Ser Cys His Gln Arg Ser Ile Asn Thr Ala Val Arg Ala Thr
150 155 160
ctc agt caa atg ctg agt gac ttg act tta cag tta cga cag agg cag 705
Leu Ser Gln Met Leu Ser Asp Leu Thr Leu Gln Leu Arg Gln Arg Gln
165 170 175
gag aat acg ata att gaa aac cca gat gtc cca cag gat ttc ggg aat 753
Glu Asn Thr Ile Ile Glu Asn Pro Asp Val Pro Gln Asp Phe Gly Asn
180 185 190
caa ggg tca aca gta gag tcc ctc tgt gat gat gtt gtc tct gta ctc 801
Gln Gly Ser Thr Val Glu Ser Leu Cys Asp Asp Val Val Ser Val Leu
195 200 205 210
acc gtc ctg tgt gag aag ctg caa gcc gcc ata aat gac agc cag cag 849
Thr Val Leu Cys Glu Lys Leu Gln Ala Ala Ile Asn Asp Ser Gln Gln
215 220 225
ctg cag ctt ctc tac ctg gag tgc atc ctg tct gtg ctc agc agc tcc 897

ES 2 613 808 T3

Leu	Gln	Leu	Leu	Tyr	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Ser	Ser		
			230					235					240				
tcc	tcc	tcc	atg	cac	ctg	cac	agg	cgc	ttc	acg	gac	ctg	atc	tgg	aaa	945	
Ser	Ser	Ser	Met	His	Leu	His	Arg	Arg	Phe	Thr	Asp	Leu	Ile	Trp	Lys		
			245				250					255					
aac	ctc	tgc	cct	gct	ctc	atc	gtg	atc	ttg	ggg	aat	cca	att	cat	gac	993	
Asn	Leu	Cys	Pro	Ala	Leu	Ile	Val	Ile	Leu	Gly	Asn	Pro	Ile	His	Asp		
	260					265					270						
aaa	acc	atc	acc	tct	gct	cac	acc	agc	agc	acc	agt	acc	agc	ctg	gag	1041	
Lys	Thr	Ile	Thr	Ser	Ala	His	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Glu		
	275				280					285					290		
tcg	gac	tct	gcg	tct	ccg	gga	gtg	tct	gac	cac	ggc	cga	gga	tca	ggc	1089	
Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Val	Ser	Asp	His	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly		
				295					300					305			
tgc	tcc	tgc	act	gcg	ccg	gcc	ctg	agc	gga	cct	gtg	gct	cgg	act	atc	1137	
Cys	Ser	Cys	Thr	Ala	Pro	Ala	Leu	Ser	Gly	Pro	Val	Ala	Arg	Thr	Ile		
			310					315					320				
tat	tac	atc	gca	gcc	gag	ctg	gtc	cgg	ctg	gtg	ggg	tct	gtg	gac	tcc	1185	
Tyr	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Leu	Val	Gly	Ser	Val	Asp	Ser		
			325				330						335				
atg	aag	ccc	gtg	ctc	cag	tcc	ctc	tac	cac	cga	gtg	ctg	ctc	tac	ccc	1233	
Met	Lys	Pro	Val	Leu	Gln	Ser	Leu	Tyr	His	Arg	Val	Leu	Leu	Tyr	Pro		
	340					345					350						
cca	ccc	cag	cac	cgg	gtg	gaa	gcc	atc	aaa	ata	atg	aaa	gag	ata	ctt	1281	
Pro	Pro	Gln	His	Arg	Val	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Met	Lys	Glu	Ile	Leu		
	355				360					365					370		
ggg	agc	cca	cag	cgt	ctc	tgt	gac	ttg	gca	gga	ccc	agc	tcc	act	gaa	1329	
Gly	Ser	Pro	Gln	Arg	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Gly	Pro	Ser	Ser	Thr	Glu		
				375					380					385			
tca	gag	tcc	aga	aaa	aga	tca	att	tca	aaa	aga	aag	tct	cat	ctg	gat	1377	
Ser	Glu	Ser	Arg	Lys	Arg	Ser	Ile	Ser	Lys	Arg	Lys	Ser	His	Leu	Asp		
			390					395					400				
ctc	ctc	aaa	ctc	atc	atg	gat	ggc	atg	acc	gaa	gca	tgc	atc	aag	ggt	1425	
Leu	Leu	Lys	Leu	Ile	Met	Asp	Gly	Met	Thr	Glu	Ala	Cys	Ile	Lys	Gly		
		405					410					415					
ggc	atc	gaa	gct	tgc	tat	gca	gcc	gtg	tcc	tgt	gtc	tgc	acc	ttg	ctg	1473	
Gly	Ile	Glu	Ala	Cys	Tyr	Ala	Ala	Val	Ser	Cys	Val	Cys	Thr	Leu	Leu		
	420					425					430						
ggt	gcc	ctg	gat	gag	ctc	agc	cag	ggg	aag	ggc	ttg	agc	gaa	ggt	cag	1521	
Gly	Ala	Leu	Asp	Glu	Leu	Ser	Gln	Gly	Lys	Gly	Leu	Ser	Glu	Gly	Gln		
	435				440					445					450		
gtg	caa	ctg	ctg	ctt	ctg	cgc	ctt	gag	gag	ctg	aag	gat	ggg	gct	gag	1569	
Val	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Glu		
				455					460					465			
tgg	agc	cga	gat	tcc	atg	gag	atc	aat	gag	gct	gac	ttc	cgc	tgg	cag	1617	
Trp	Ser	Arg	Asp	Ser	Met	Glu	Ile	Asn	Glu	Ala	Asp	Phe	Arg	Trp	Gln		
			470					475					480				
cgg	cga	gtg	ctg	tcc	tca	gaa	cac	acg	ccg	tgg	gag	tca	ggg	aac	gag	1665	
Arg	Arg	Val	Leu	Ser	Ser	Glu	His	Thr	Pro	Trp	Glu	Ser	Gly	Asn	Glu		

ES 2 613 808 T3

485					490					495							
agg Arg	agc Ser	ctt Leu	gac Asp	atc Ile	agc Ser	atc Ile	agt Ser	gtc Val	acc Thr	aca Thr	gac Asp	aca Thr	ggc Gly	cag Gln	acc Thr	1713	
500					505					510							
act Thr	ctc Leu	gag Glu	gga Gly	gag Glu	ttg Leu	ggt Gly	cag Gln	act Thr	aca Thr	ccc Pro	gag Glu	gac Asp	cat His	tcg Ser	gga Gly	1761	
515					520					525					530		
aac Asn	cac His	aag Lys	aac Asn	agt Ser	ctc Leu	aag Lys	tcg Ser	cca Pro	gcc Ala	atc Ile	cca Pro	gag Glu	ggt Gly	aag Lys	gag Glu	1809	
535					540					545							
acg Thr	ctg Leu	agc Ser	aaa Lys	gta Val	ttg Leu	gaa Glu	aca Thr	gag Glu	gcg Ala	gta Val	gac Asp	cag Gln	cca Pro	gat Asp	gtc Val	1857	
550					555					560							
gtg Val	cag Gln	aga Arg	agc Ser	cac His	acg Thr	gtc Val	cct Pro	tac Tyr	cct Pro	gac Asp	ata Ile	act Thr	aac Asn	ttc Phe	ctg Leu	1905	
565					570					575							
tca Ser	gta Val	gac Asp	tgc Cys	agg Arg	aca Thr	agg Arg	tcc Ser	tat Tyr	gga Gly	tct Ser	agg Arg	tat Tyr	agt Ser	gag Glu	agc Ser	1953	
580					585					590							
aat Asn	ttt Phe	agc Ser	gtt Val	gat Asp	gac Asp	caa Gln	gac Asp	ctt Leu	tct Ser	agg Arg	aca Thr	gag Glu	ttt Phe	gat Asp	tcc Ser	2001	
595					600					605					610		
tgt Cys	gat Asp	cag Gln	tac Tyr	tct Ser	atg Met	gca Ala	gca Ala	gaa Glu	aag Lys	gac Asp	tcg Ser	ggc Gly	agg Arg	tcc Ser	gac Asp	2049	
615					620					625							
gtg Val	tca Ser	gac Asp	att Ile	ggg Gly	tcg Ser	gac Asp	aac Asn	tgt Cys	tca Ser	cta Leu	gcc Ala	gat Asp	gaa Glu	gag Glu	cag Gln	2097	
630					635					640							
aca Thr	ccc Pro	cgg Arg	gac Asp	tgc Cys	cta Leu	ggc Gly	cac His	cgg Arg	tcc Ser	ctg Leu	cga Arg	act Thr	gcc Ala	gcc Ala	ctg Leu	2145	
645					650					655							
tct Ser	cta Leu	aaa Lys	ctg Leu	ctg Leu	aag Lys	aac Asn	cag Gln	gag Glu	gcg Ala	gat Asp	cag Gln	cac His	agc Ser	gcc Ala	agg Arg	2193	
660					665					670							
ctg Leu	ttc Phe	ata Ile	cag Gln	tcc Ser	ctg Leu	gaa Glu	ggc Gly	ctc Leu	ctc Leu	cct Pro	cgg Arg	ctc Leu	ctg Leu	tct Ser	ctc Leu	2241	
675					680					685					690		
tcc Ser	aat Asn	gta Val	gag Glu	gag Glu	gtg Val	gac Asp	acc Thr	gct Ala	ctg Leu	cag Gln	aac Asn	ttt Phe	gcc Ala	tct Ser	act Thr	2289	
695					700					705							
ttc Phe	tgc Cys	tca Ser	ggc Gly	atg Met	atg Met	cac His	tct Ser	cct Pro	ggc Gly	ttt Phe	gac Asp	ggg Gly	aat Asn	agc Ser	agc Ser	2337	
710					715					720							
ctc Leu	agc Ser	ttc Phe	cag Gln	atg Met	ctg Leu	atg Met	aac Asn	gca Ala	gac Asp	agc Ser	ctc Leu	tac Tyr	aca Thr	gct Ala	gca Ala	2385	
725					730					735							
cac His	tgc Cys	gcc Ala	ctg Leu	ctc Leu	ctc Leu	aac Asn	ctg Leu	aag Lys	ctc Leu	tcc Ser	cac His	ggt Gly	gac Asp	tac Tyr	tac Tyr	2433	
740					745					750							

ES 2 613 808 T3

agg aag cgg ccg acc ctg gcg cca ggc gtg atg aag gac ttc atg aag Arg Lys Arg Pro Thr Leu Ala Pro Gly Val Met Lys Asp Phe Met Lys 755 760 765 770	2481
cag gtg cag acc agc ggc gtg ctg atg gtc ttc tct cag gcc tgg att Gln Val Gln Thr Ser Gly Val Leu Met Val Phe Ser Gln Ala Trp Ile 775 780 785	2529
gag gag ctc tac cat cag gtg ctc gac agg aac atg ctt gga gag gct Glu Glu Leu Tyr His Gln Val Leu Asp Arg Asn Met Leu Gly Glu Ala 790 795 800	2577
ggc tat tgg ggc agc cca gaa gat aac agc ctt ccc ctc atc aca atg Gly Tyr Trp Gly Ser Pro Glu Asp Asn Ser Leu Pro Leu Ile Thr Met 805 810 815	2625
ctg acc gat att gac ggc tta gag agc agt gcc att ggt ggc cag ctg Leu Thr Asp Ile Asp Gly Leu Glu Ser Ser Ala Ile Gly Gly Gln Leu 820 825 830	2673
atg gcc tcg gct gct aca gag tct cct ttc gcc cag agc agg aga att Met Ala Ser Ala Ala Thr Glu Ser Pro Phe Ala Gln Ser Arg Arg Ile 835 840 845 850	2721
gat gac tcc aca gtg gca ggc gtg gca ttt gct cgc tat att ctg gtg Asp Asp Ser Thr Val Ala Gly Val Ala Phe Ala Arg Tyr Ile Leu Val 855 860 865	2769
ggc tgc tgg aag aac ttg atc gat act tta tca acc cca ctg act ggt Gly Cys Trp Lys Asn Leu Ile Asp Thr Leu Ser Thr Pro Leu Thr Gly 870 875 880	2817
cga atg gcg ggg agc tcc aaa ggg ctg gcc ttc att ctg gga gct gaa Arg Met Ala Gly Ser Ser Lys Gly Leu Ala Phe Ile Leu Gly Ala Glu 885 890 895	2865
ggc atc aaa gag cag aac cag aag gag cgg gac gcc atc tgc atg agc Gly Ile Lys Glu Gln Asn Gln Lys Glu Arg Asp Ala Ile Cys Met Ser 900 905 910	2913
ctc gac ggg ctg cgg aaa gcc gca cgg ctg agc tgc gct cta ggc gtt Leu Asp Gly Leu Arg Lys Ala Ala Arg Leu Ser Cys Ala Leu Gly Val 915 920 925 930	2961
gct gct aac tgc gcc tca gcc ctt gcc cag atg gca gct gcc tcc tgt Ala Ala Asn Cys Ala Ser Ala Leu Ala Gln Met Ala Ala Ala Ser Cys 935 940 945	3009
gtc caa gaa gaa aaa gaa gag agg gag gcc caa gaa ccc agt gat gcc Val Gln Glu Glu Lys Glu Glu Arg Glu Ala Gln Glu Pro Ser Asp Ala 950 955 960	3057
atc aca caa gtg aaa cta aaa gtg gag cag aaa ctg gag cag att ggg Ile Thr Gln Val Lys Leu Lys Val Glu Gln Lys Leu Glu Gln Ile Gly 965 970 975	3105
aag gtg cag ggg gtg tgg ctg cac act gcc cac gtc ttg tgc atg gag Lys Val Gln Gly Val Trp Leu His Thr Ala His Val Leu Cys Met Glu 980 985 990	3153
gcc atc ctc agc gta ggc ctg gag atg gga agc cac aac ccg gac Ala Ile Leu Ser Val Gly Leu Glu Met Gly Ser His Asn Pro Asp 995 1000 1005	3198

ES 2 613 808 T3

tgc Cys 1010	tgg Trp	cca Pro	cac His	gtg Val	ttc Phe	agg Arg	gtg Val	tgt Cys	gaa Glu	tac Tyr	gtg Val	ggc Gly	acc Thr	ctg Leu	3243
gag Glu 1025	cac His	aac Asn	cac His	ttc Phe	agc Ser	gat Asp	ggc Gly	tgc Ala	cag Ser	ccc Gln	cct Pro	ctg Pro	acc Leu	thr Thr	3288
atc Ile 1040	agc Ser	cag Gln	ccc Pro	cag Gln	aag Lys	gcc Ala	act Thr	gga Gly	agc Ser	gct Ala	ggc Gly	ctc Leu	ctt Leu	ggg Gly	3333
gac Asp 1055	ccc Pro	gag Glu	tgt Cys	gag Glu	ggc Gly	tgc Ser	ccc Pro	ccc Pro	gag Glu	cac His	agc Ser	ccg Pro	gag Glu	cag Gln	3378
ggg Gly 1070	cgc Arg	tcc Ser	ctg Leu	agc Ser	acg Met	gcc Ala	cct Pro	gtc Val	gtc Val	cag Gln	ccc Pro	ctg Leu	tcc Ser	atc Ile	3423
cag Gln 1085	gac Asp	ctc Leu	gtc Val	cgc Arg	gaa Glu	ggc Gly	agc Ser	cgc Arg	ggc Gly	cgc Arg	gcc Ala	tcc Ser	gac Asp	ttc Phe	3468
cgc Arg 1100	ggc Gly	ggg Gly	agc Ser	ctc Leu	atg Met	agc Ser	ggg Gly	agc Ser	agc Ser	gcg Ala	gcc Ala	aag Lys	gtg Val	gtg Val	3513
ctc Leu 1115	acc Thr	ctc Leu	tcc Ser	acg Thr	caa Gln	gcc Ala	gac Asp	agg Arg	ctc Leu	ttt Phe	gaa Glu	gat Asp	gct Ala	acg Thr	3558
gat Asp 1130	aag Lys	ttg Leu	aac Asn	ctc Leu	atg Met	gcc Ala	ttg Leu	gga Gly	ggc Gly	ttt Phe	ctt Leu	tac Tyr	cag Gln	ctg Leu	3603
aag Lys 1145	aaa Lys	gca Ala	tgc Ser	cag Gln	tct Ser	cag Gln	ctt Leu	ttc Phe	cat His	tct Ser	gtt Val	aca Thr	gat Asp	aca Thr	3648
gtt Val 1160	gat Asp	tac Tyr	tct Ser	ctg Leu	gca Ala	atg Met	cca Pro	gga Gly	gaa Glu	gtt Val	aaa Lys	tcc Ser	act Thr	caa Gln	3693
gac Asp 1175	cga Arg	aaa Lys	agc Ser	gcc Ala	ctc Leu	cac His	ctg Leu	ttc Phe	cgc Arg	ctg Leu	ggg Gly	aat Asn	gcc Ala	atg Met	3738
ctg Leu 1190	agg Arg	att Ile	gtg Val	cgc Arg	agc Ser	aaa Lys	gca Ala	cgc Arg	ccc Pro	ctg Leu	ctc Leu	cac His	gtg Val	atg Met	3783
cgc Arg 1205	tgc Cys	tgg Trp	agc Ser	ctt Leu	gtg Val	gcc Ala	cca Pro	cac His	ctg Leu	gtg Val	gag Glu	gct Ala	gct Ala	tgc Cys	3828
cat His 1220	aag Lys	gaa Glu	aga Arg	cat His	gtg Val	tct Ser	cag Gln	aag Lys	gct Ala	gtt Val	tcc Ser	ttc Phe	atc Ile	cat His	3873
gac Asp 1235	ata Ile	ctg Leu	aca Thr	gaa Glu	gtc Val	ctc Leu	act Thr	gac Asp	tgg Trp	aat Asn	gag Glu	cca Pro	cct Pro	cat His	3918
ttt	cac	ttc	aat	gaa	gca	ctc	ttc	cga	cct	ttc	gag	cgc	att	atg	3963

ES 2 613 808 T3

Phe 1250	His	Phe	Asn	Glu	Ala 1255	Leu	Phe	Arg	Pro	Phe 1260	Glu	Arg	Ile	Met	
cag Gln 1265	ctg Leu	gaa Glu	ttg Leu	tgt Cys	gat Asp 1270	gag Glu	gac Asp	gtc Val	caa Gln	gac Asp 1275	cag Gln	gtt Val	gtc Val	aca Thr	4008
tcc Ser 1280	att Ile	ggt Gly	gag Glu	ctg Leu	gtt Val 1285	gaa Glu	gtg Val	tgt Cys	tcc Ser	acg Thr 1290	cag Gln	atc Ile	cag Gln	tcg Ser	4053
gga Gly 1295	tgg Trp	aga Arg	ccc Pro	ttg Leu	ttc Phe 1300	agt Ser	gcc Ala	ctg Leu	gaa Glu	aca Thr 1305	gtg Val	cat His	ggc Gly	ggg Gly	4098
aac Asn 1310	aag Lys	tca Ser	gag Glu	atg Met	aag Lys 1315	gag Glu	tac Tyr	ctg Leu	gtt Val	ggt Gly 1320	gac Asp	tac Tyr	tcc Ser	atg Met	4143
gga Gly 1325	aaa Lys	ggc Gly	caa Gln	gct Ala	cca Pro 1330	gtg Val	ttt Phe	gat Asp	gta Val	ttt Phe 1335	gaa Glu	gct Ala	ttt Phe	ctc Leu	4188
aat Asn 1340	act Thr	gac Asp	aac Asn	atc Ile	cag Gln 1345	gtc Val	ttt Phe	gct Ala	aat Asn	gca Ala 1350	gcc Ala	act Thr	agc Ser	tac Tyr	4233
atc Ile 1355	atg Met	tgc Cys	ctt Leu	atg Met	aag Lys 1360	ttt Phe	gtc Val	aaa Lys	gga Gly	ctg Leu 1365	ggg Gly	gag Glu	gtg Val	gac Asp	4278
tgt Cys 1370	aaa Lys	gag Glu	att Ile	gga Gly	gac Asp 1375	tgt Cys	gcc Ala	cca Pro	gca Ala	ccc Pro 1380	gga Gly	gcc Ala	ccg Pro	tcc Ser	4323
aca Thr 1385	gac Asp	ctg Leu	tgc Cys	ctc Leu	ccg Pro 1390	gcc Ala	ctg Leu	gat Asp	tac Tyr	ctc Leu 1395	agg Arg	cgc Arg	tgc Cys	tct Ser	4368
cag Gln 1400	tta Leu	ttg Leu	gcc Ala	aaa Lys	atc Ile 1405	tac Tyr	aaa Lys	atg Met	ccc Pro	ttg Leu 1410	aag Lys	cca Pro	ata Ile	ttc Phe	4413
ctt Leu 1415	agt Ser	ggg Gly	aga Arg	ctt Leu	gcc Ala 1420	ggc Gly	ttg Leu	cct Pro	cga Arg	aga Arg 1425	ctt Leu	cag Gln	gaa Glu	cag Gln	4458
tca Ser 1430	gcc Ala	agc Ser	agt Ser	gag Glu	gat Asp 1435	gga Gly	att Ile	gaa Glu	tca Ser	gtc Val 1440	ctg Leu	tct Ser	gat Asp	ttt Phe	4503
gat Asp 1445	gat Asp	gac Asp	acc Thr	ggt Gly	ctg Leu 1450	ata Ile	gaa Glu	gtc Val	tgg Trp	ata Ile 1455	atc Ile	ctg Leu	ctg Leu	gag Glu	4548
cag Gln 1460	ctg Leu	aca Thr	gcg Ala	gct Ala	gtg Val 1465	tcc Ser	aat Asn	tgt Cys	cca Pro	cgg Arg 1470	cag Gln	cac His	caa Gln	cca Pro	4593
cca Pro 1475	act Thr	ctg Leu	gat Asp	tta Leu	ctc Leu 1480	ttt Phe	gag Glu	ctg Leu	ttg Leu	aga Arg 1485	gat Asp	gtg Val	acg Thr	aaa Lys	4638
aca Thr	cca Pro	gga Gly	cca Pro	ggg Gly	ttt Phe	ggt Gly	atc Ile	tat Tyr	gca Ala	gtg Val	gtt Val	cac His	ctc Leu	ctc Leu	4683

ES 2 613 808 T3

1490											1495											1500											
ctt	cct	gtg	atg	tcc	gtt	tgg	ctc	cgc	cgg	agc	cat	aaa	gac	cat		4728																	
Leu	Pro	Val	Met	Ser	Val	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	His	Lys	Asp	His																			
1505											1510											1515											
tcc	tac	tgg	gat	atg	gcc	tct	gcc	aat	ttc	aag	cac	gct	att	ggt		4773																	
Ser	Tyr	Trp	Asp	Met	Ala	Ser	Ala	Asn	Phe	Lys	His	Ala	Ile	Gly																			
1520											1525											1530											
ctg	tcc	tgt	gag	ctg	gtg	gtg	gag	cac	att	caa	agc	ttt	cta	cat		4818																	
Leu	Ser	Cys	Glu	Leu	Val	Val	Glu	His	Ile	Gln	Ser	Phe	Leu	His																			
1535											1540											1545											
tca	gat	atc	agg	tac	gag	agc	atg	atc	aat	acc	atg	ctg	aag	gac		4863																	
Ser	Asp	Ile	Arg	Tyr	Glu	Ser	Met	Ile	Asn	Thr	Met	Leu	Lys	Asp																			
1550											1555											1560											
ctc	ttt	gag	ttg	ctg	gtc	gcc	tgt	gtg	gcc	aag	ccc	act	gaa	acc		4908																	
Leu	Phe	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Cys	Val	Ala	Lys	Pro	Thr	Glu	Thr																			
1565											1570											1575											
atc	tcc	aga	gtg	ggc	tgc	tcc	tgt	att	aga	tac	gtc	ctt	gtg	aca		4953																	
Ile	Ser	Arg	Val	Gly	Cys	Ser	Cys	Ile	Arg	Tyr	Val	Leu	Val	Thr																			
1580											1585											1590											
gcg	ggc	cct	gtg	ttc	act	gag	gag	atg	tgg	agg	ctt	gcc	tgc	tgt		4998																	
Ala	Gly	Pro	Val	Phe	Thr	Glu	Glu	Met	Trp	Arg	Leu	Ala	Cys	Cys																			
1595											1600											1605											
gcc	ctg	caa	gat	gcg	ttc	tct	gcc	aca	ctc	aag	cca	gtg	aag	gac		5043																	
Ala	Leu	Gln	Asp	Ala	Phe	Ser	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Val	Lys	Asp																			
1610											1615											1620											
ctg	ctg	ggc	tgc	ttc	cac	agc	ggc	acg	gag	agc	ttc	agc	ggg	gaa		5088																	
Leu	Leu	Gly	Cys	Phe	His	Ser	Gly	Thr	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly	Glu																			
1625											1630											1635											
ggc	tgc	cag	gtg	cga	gtg	gcg	gcc	ccg	tcc	tcc	tcc	cca	agt	gcc		5133																	
Gly	Cys	Gln	Val	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Ala																			
1640											1645											1650											
gag	gcc	gag	tac	tgg	cgc	atc	cga	gcc	atg	gcc	cag	cag	gtg	ttt		5178																	
Glu	Ala	Glu	Tyr	Trp	Arg	Ile	Arg	Ala	Met	Ala	Gln	Gln	Val	Phe																			
1655											1660											1665											
atg	ctg	gac	acc	cag	tgc	tca	cca	aag	aca	cca	aac	aac	ttt	gac		5223																	
Met	Leu	Asp	Thr	Gln	Cys	Ser	Pro	Lys	Thr	Pro	Asn	Asn	Phe	Asp																			
1670											1675											1680											
cac	gct	cag	tcc	tgc	cag	ctc	att	att	gag	ctg	cct	cct	gat	gaa		5268																	
His	Ala	Gln	Ser	Cys	Gln	Leu	Ile	Ile	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Glu																			
1685											1690											1695											
aaa	cca	aat	gga	cac	acc	aag	aaa	agc	gtg	tct	ttc	agg	gaa	att		5313																	
Lys	Pro	Asn	Gly	His	Thr	Lys	Lys	Ser	Val	Ser	Phe	Arg	Glu	Ile																			
1700											1705											1710											
gtg	gtg	agc	ctg	ctg	tct	cat	cag	gtg	tta	ctc	cag	aac	tta	tat		5358																	
Val	Val	Ser	Leu	Leu	Ser	His	Gln	Val	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr																			
1715											1720											1725											
gac	atc	ttg	tta	gaa	gag	ttt	gtc	aaa	ggc	ccc	tct	cct	gga	gag		5403																	
Asp	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Lys	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Glu																			
1730											1735											1740											

ES 2 613 808 T3

gaa Glu 1745	aag Lys	acg Thr	ata Ile	caa Gln	gtg Val 1750	cca Pro	gaa Glu	gcc Ala	aag Lys	ctg Leu 1755	gct Ala	ggc Gly	ttc Phe	ctc Leu	5448
aga Arg 1760	tac Tyr	atc Ile	tct Ser	atg Met	cag Gln 1765	aac Asn	ttg Leu	gca Ala	gtc Val	ata Ile 1770	ttc Phe	gac Asp	ctg Leu	ctg Leu	5493
ctg Leu 1775	gac Asp	tct Ser	tat Tyr	agg Arg	act Thr 1780	gcc Ala	agg Arg	gag Glu	ttt Phe	gac Asp 1785	acc Thr	agc Ser	ccc Pro	ggg Gly	5538
ctg Leu 1790	aag Lys	tgc Cys	ctg Leu	ctg Leu	aag Lys 1795	aaa Lys	gtg Val	tct Ser	ggc Gly	atc Ile 1800	ggg Gly	ggc Gly	gcc Ala	gcc Ala	5583
aac Asn 1805	ctc Leu	tac Tyr	cgc Arg	cag Gln	tct Ser 1810	gcg Ala	atg Met	agc Ser	ttt Phe	aac Asn 1815	att Ile	tat Tyr	ttc Phe	cac His	5628
gcc Ala 1820	ctg Leu	gtg Val	tgt Cys	gct Ala	gtt Val 1825	ctc Leu	acc Thr	aat Asn	caa Gln	gaa Glu 1830	acc Thr	atc Ile	acg Thr	gcc Ala	5673
gag Glu 1835	caa Gln	gtg Val	aag Lys	aag Lys	gtc Val 1840	ctt Leu	ttt Phe	gag Glu	gac Asp	gac Asp 1845	gag Glu	aga Arg	agc Ser	acg Thr	5718
gat Asp 1850	tct Ser	tcc Ser	cag Gln	cag Gln	tgt Cys 1855	tca Ser	tct Ser	gag Glu	gat Asp	gaa Glu 1860	gac Asp	atc Ile	ttt Phe	gag Glu	5763
gaa Glu 1865	acc Thr	gcc Ala	cag Gln	gtc Val	agc Ser 1870	ccc Pro	ccg Pro	aga Arg	ggc Gly	aag Lys 1875	gag Glu	aag Lys	aga Arg	cag Gln	5808
tgg Trp 1880	cgg Arg	gca Ala	cgg Arg	atg Met	ccc Pro 1885	ttg Leu	ctc Leu	agc Ser	gtc Val	cag Gln 1890	cct Pro	gtc Val	agc Ser	aac Asn	5853
gca Ala 1895	gat Asp	tgg Trp	gtg Val	tgg Trp	ctg Leu 1900	gtc Val	aag Lys	agg Arg	ctg Leu	cac His 1905	aag Lys	ctg Leu	tgc Cys	atg Met	5898
gaa Glu 1910	ctg Leu	tgc Cys	aac Asn	aac Asn	tac Tyr 1915	atc Ile	cag Gln	atg Met	cac His	ttg Leu 1920	gac Asp	ctg Leu	gag Glu	aac Asn	5943
tgt Cys 1925	atg Met	gag Glu	gag Glu	cct Pro	ccc Pro 1930	atc Ile	ttc Phe	aag Lys	ggc Gly	gac Asp 1935	ccg Pro	ttc Phe	ttc Phe	atc Ile	5988
ctg Leu 1940	ccc Pro	tcc Ser	ttc Phe	cag Gln	tcc Ser 1945	gag Glu	tca Ser	tcc Ser	acc Thr	cca Pro 1950	tcc Ser	acc Thr	ggg Gly	ggc Gly	6033
ttc Phe 1955	tct Ser	ggg Gly	aaa Lys	gaa Glu	acc Thr 1960	cct Pro	tcc Ser	gag Glu	gat Asp	gac Asp 1965	aga Arg	agc Ser	cag Gln	tcc Ser	6078
cgg Arg 1970	gag Glu	cac His	atg Met	ggc Gly	gag Glu 1975	tcc Ser	ctg Leu	agc Ser	ctg Leu	aag Lys 1980	gcc Ala	ggt Gly	ggt Gly	ggg Gly	6123

ES 2 613 808 T3

gac Asp 1985	ctg Leu	ctg Leu	ctg Leu	ccc Pro	ccc Pro	agc Ser	ccc Pro	aaa Lys	gtg Val	gag Glu	aag Lys	aag Lys	gat Asp	ccc Pro	6168
agc Ser 2000	cgg Arg	aag Lys	aag Lys	gag Glu	tgg Trp	tgg Trp	gag Glu	aat Asn	gcg Ala	ggg Gly	aac Asn	aaa Lys	atc Ile	tac Tyr	6213
acc Thr 2015	atg Met	gca Ala	gcc Ala	gac Asp	aag Lys	acc Thr	att Ile	tca Ser	aag Lys	ttg Leu	atg Met	acc Thr	gaa Glu	tac Tyr	6258
aaa Lys 2030	aag Lys	agg Arg	aaa Lys	cag Gln	cag Gln	cac His	aac Asn	ctg Leu	tcc Ser	gcg Ala	ttc Phe	ccc Pro	aaa Lys	gag Glu	6303
gtc Val 2045	aaa Lys	gtg Val	gag Glu	aag Lys	aaa Lys	gga Gly	gag Glu	cca Pro	ctg Leu	ggt Gly	ccc Pro	agg Arg	ggc Gly	cag Gln	6348
gac Asp 2060	tcc Ser	cgg Pro	ctg Leu	ctt Leu	cag Gln	cgt Arg	ccc Pro	cag Gln	cac His	ttg Leu	atg Met	gac Asp	caa Gln	ggg Gly	6393
caa Gln 2075	atg Met	cgg Arg	cat His	tcc Ser	ttc Phe	agc Ser	gca Ala	ggc Gly	ccc Pro	gag Glu	ctg Leu	ctg Leu	cga Arg	cag Gln	6438
gac Asp 2090	aag Lys	agg Arg	ccc Pro	cgc Arg	tca Ser	ggc Gly	tcc Ser	acc Thr	ggg Gly	agc Ser	tcc Ser	ctc Leu	agt Ser	gtc Val	6483
tcg Ser 2105	gtg Val	aga Arg	gac Asp	gca Ala	gaa Glu	gca Ala	cag Gln	atc Ile	cag Gln	gca Ala	tgg Trp	acc Thr	aac Asn	atg Met	6528
gtg Val 2120	cta Leu	aca Thr	gtt Val	ctc Leu	aat Asn	cag Gln	att Ile	cag Gln	att Ile	ctc Leu	cca Pro	gac Asp	cag Gln	acc Thr	6573
ttc Phe 2135	acg Thr	gcc Ala	ctc Leu	cag Gln	ccc Pro	gca Ala	gtg Val	ttc Phe	ccg Pro	tgc Cys	atc Ile	agt Ser	cag Gln	ctg Leu	6618
acc Thr 2150	tgt Cys	cac His	gtg Val	acc Thr	gac Asp	atc Ile	aga Arg	gtt Val	cgc Arg	cag Gln	gct Ala	gtg Val	agg Arg	gag Glu	6663
tgg Trp 2165	ctg Leu	ggc Gly	agg Arg	gtg Val	ggc Gly	cgt Arg	gtc Val	tat Tyr	gac Asp	atc Ile	att Ile	gtg Val	tag		6705
ccgactcctg	ttctactctc	ccaccaata	acagtagtga	gggttagagt	cctgccaata	6765									
cagctgttgc	attttcccca	ccactagccc	cacttaaact	actactactg	tctcagagaa	6825									
cagtgtttcc	taatgtaaaa	agcctttcca	accactgato	agcattgggg	ccatactaag	6885									
gtttgtatct	agatgacaca	aacgatattc	tgattttgca	cattattata	gaagaatcta	6945									
taatccttga	tatgtttcta	actottgaag	tatatttccc	agtgcttttg	cttacagtgt	7005									
tgtccccaaa	tgggtcattt	tcaaggatta	ctcatttgaa	aacactatat	tgatccattt	7065									
gatccatcat	ttaaaaaata	aatacaattc	ctaaggcaat	atctgctggg	aagtcaagct	7125									

ES 2 613 808 T3

gataaacact cagacatcta gtaccagga ttattaattg gaggaagatt tatggttatg	7185
ggtctggctg ggaagaagac aactataaat acatattctt ggggtgcata atcaagaaag	7245
aggtgacttc tgttgtaaaa taatccagaa cacttcaaaa ttattcctaa atcattaaga	7305
ttttcaggta ttcaccaatt tccccatgta aggtactgtg ttgtacctt atttctgtat	7365
ttctaaaaga agaaagttct ttcctagcag ggtttgaagt ctgtggctta tcagcctgtg	7425
acacagagta cccagtgaat gtggctggta cgtagattgt caagagacat aagaccgacc	7485
agccaccctg gctgttcttg tgggtgttgt tcccatcccc aaggcaaaac aggaaaggaa	7545
aggaaagaag aaaaggtgcc ttagtccttt gttgcacttc catttccatg cccacaatt	7605
gtctgaacat aaggtatagc atttggtttt taagaaaaa aaacattaag acgcaactca	7665
ttttatatca acacgcttg aggaaaggga ctgagggaag ggagcaggga gtgtggggtg	7725
gggatggatt atgatgaaat ctttttcaat cttaaaatat aatacaaaa tcttgcaaaa	7785
ttatggtgtc agttacacaa gctctagtct caaaatgaaa gtaatggaga aagacactga	7845
aatttagaaa attttgtcg tttaaaatat ttctcctatc taccaagtaa agttacccta	7905
tgtttgatgt ctttgcattc agaccaatat ttcaggtgga ttttctaaag tattactaga	7965
aaatacgttt gaaagcttta tcttattatt tacagtattt ttatatttct tacattatcc	8025
taatgattga aaactcctca atcaagctta cttacacaca ttctacagag ttatttaagg	8085
catacattat aatctcccag cccattcat aatgaataag tcacccttta aatataagac	8145
acaaattcta cagtattgaa ataaggatth aaaggggtat ttgtaaactt tgccctcctt	8205
gagaaatatg gaactacctt agaggttaag aggaaggcag tgttctgact tctttagggtg	8265
atctgaaaaa aacaccctta tcatccagtg taccatctag agatcaccac agaattcatt	8325
tttttcccag ttccacaaaa cactctgttt gccttcagtt tttactcact agacaataat	8385
tcaagtttag aaacaggtaa tcagctatth gatcttaaaa ggcaatgaat tgttgggata	8445
tcagtgaact atgttgtata cttttgaatt tttacatth ataaatggaa ttgaaagttg	8505
gataactgct ttttttaaatt tttccaacag aagtaacacc acagttgctt tgtttctttt	8565
tatagcttac ctgaggttca gttcttcttt gtgaacctgt gagtactcca cagtttactg	8625
ggggaaaagg cttcagtaaa gcagaggcta gaattacagt atttatacat agcaactttt	8685
cataaagtag aaaaattcaa aggaagctgt ctcaatttga gaataccagc tgggcacggt	8745
ggctcacgcc tgtaatccca gcacttactt tgggaggcca aggtgggcag ataacctgcg	8805
gtcaggagtt tgagaccagg ctggacaaca tggtgaaacc tcgtctctac taaaaatata	8865
aaaattagcc aggtgtggta ggatgcacct gtaatcccag ctacttagga ggccgagaca	8925
ggagaatcgc tcgaaccag gaggcggacg ttgcagtgcg ccaagattgc accattgcac	8985
tccagactgg gtgacaagag tgaaactcca tctaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagtgaata	9045

ES 2 613 808 T3

ctgtatccca aagtatgtta gttgtttgtt tggaaatcag cattctcccc gatgctctat 9105
 tatgggatcc aaaattcttg aacataagtt taccctgtac tgtgtccaaa cactgttcta 9165
 gttctagcct gattatgggt cccaagaata aaaggatgag taggtgtaca gagctcttga 9225
 cctacaattt ttttaagagt ttttggtagc ttcccattgt cttctctata actcagtcct 9285
 aacatactct gcactcgagt taccagccat ccacactgac atcagatttc aaccagaacc 9345
 atcactgagt gacagcagta cttctcagag gtatttgcag cttgatgcaa agtagtctct 9405
 aatgagtagg cattcaggtg gttcttccca gcagggtggag aagaaaggga ggagatgaag 9465
 aacactgaga ggggagtggt accttcccag gctgcccagc tcagtctctt gccctgttcc 9525
 tgtgactcag ctgcccactc ccccaacttt gtttccctcc ctcccagtct ctgaaagtgt 9585
 caggtgtttc tctcctcaca gtctcttttg cagcaacagt aagacaaaat tcaaggcagc 9645
 cttttaaagt tacgaacagt tattagcatg tatttacaga cctaagcaga atgagagtgt 9705
 atacattgtt tttagttgcc tgtatttata gccaaaagta tattacctta aagttgagat 9765
 ctttctcttc ttttctctaa ttttggtaaa gtgtgcttca tgaaacaaac atctggaaaa 9825
 ctccaagtat aagagaccct ggactgatga tggcccagcc aagtatatgg agggacagag 9885
 ttctctctgt cattaatgag gacatcggtt ttcacaattg aaactcatgc actgtccaca 9945
 gcactctacc tagctcctgt atctcctgat ctgcttttaa aaatagttag ttaggctgcc 10005
 tttttacacc accttctctc tctccccttg tggtaathtt ccagccttcc ccatagatat 10065
 aaaactagaa cacctttatg atttggggtc tatgtaatga ctgaccgata agaaccagag 10125
 cagatgctaa catacttaac agctcgcat aaataacttt aaatcaggcg tgatggctca 10185
 ttctgtaat ctcaagcact ttgggaggct aagggtgggtg gatctcttga ggtcaggagt 10245
 tctgagacaa cctggccaac gtggtgaaac cccgtctcta ctaaaaatac aaaattagcc 10305
 gggcatggtg gcagctgcct gtaatcccag ctactcggga agctgaggca ggagaattgc 10365
 ttgaacctgg gaggtgggga ttgcagtcag ccaagattgt tctgcagcat gggtgacaaa 10425
 gtgagacttc gtctcaagta aataaaacta aaatttttaa atcaaactg acaaaaatgt 10485
 taatataatt cagaagtacc ttgaaattga aacatatttg tgcaatgatc attaggcttt 10545
 ttgtccttgt tgttttaaaa tgaggcttat acagagtgag ttgagagtca agtagccttc 10605
 gctgtgagac ggtaatgcag ttatataata gatacccttg actttgccag attcatcaca 10665
 atactgctta tacaggaaag ttttctcaga aaggaaaatc cattagtatc agtcccatca 10725
 agccaaacag aatgaagacc tttgatagta atagcaagag gttacaaata gcaggaggga 10785
 ggcgagtagt gaatgtcact gtgattgcaa acccttacct gtattatcac acgtagtcct 10845
 cacaacaacc ttgtgagaca agtggttgtt tcctcathtt ttcagagggg aacacagacc 10905
 cagagagggt aagaaatttg cccaagataa caagtaaaag gcaaagtggg ttgcaaaaga 10965
 ggtgtttctg aattcaaggg ccatactctc tctctgacaa catgctctaa gtccatagag 11025

ES 2 613 808 T3

taagcactct agtatgaaaa aaagtttcaa ggaacgaggc catgaaaatg agactatttg 11085
 acatctcaga tctgtctggg atgttatgga ggttttttaa aataaagttg aaaaaagaaa 11145
 atgaatcatg tttatacata aaaaaatcac atgtaacaca tttcaagtgt ttgaaaataa 11205
 aaccaaatac taaacttttag ttttcaagca gacattcagt gttacttttag aaaactcact 11265
 gaattaggtg gaaatgatgg aataatacta ttcattggcca gctattaaca cagaagaaca 11325
 tggcagtggtg tgtctggaac ggcatgcaca atttgtaaac ctttttcaaa tatcatttaa 11385
 tcaactcaga ataaagtgcc ctgtagccaa cagtgcctct ttacttgctt ctctgggaaa 11445
 tacatggtac taaattagta gcacaaagt tgggaatatg caaaataatg gataaccatt 11505
 tttcaaaatg tacattctct gaagaggaag cagctggttg gacaggattt cttgaagagc 11565
 caggtgctaa gggcatcagg tcgacatcca tagtaaccat gtgccataac atctacacat 11625
 ttccacttgt tttacagaca aggtaacagg cagaaggaaa atccagagtc ttgcagtaag 11685
 cagatgacaa aacttcaata tgcttgggca ccacttaggt gaccccaggg agatttagtg 11745
 tggccttagg aaagcaaaag agcacttttt attggaataa tgagcttgct actgggaaag 11805
 atttgtaaaa ttgatcaaga acttgattta taattatgcc tcaaaaaaa aagttctcat 11865
 ttagtagtg agcaatctag aaaacatacc ttttttggtt gtttggaaga tcctctttcc 11925
 ctggctgtat tgtagtgtt gctatttgat gtggaaataa ctaataactt aagatttttg 11985
 aacagaacac ctttagatt tccaaaacac aattcttatt tcagggaaga cagacaaaa 12045
 atatctcctg agatcattgg tttctttata aattgtggta ccactccatc attgaagaga 12105
 aaccactacc acaccactag caccatacag aaccttttct ctgtatcttt gtacaatact 12165
 acaaaagggg accaggagg agagagtggc tgaccacttt agtgacaaaa cagcactcca 12225
 ctgctgggtg atcccatcta attatggtcc ttccaccctt ttcaaccacc aacaactggt 12285
 cgtactgtta attcctatcc tgaaggttta accagtgggt gtctagtatc ttctgtcttt 12345
 agaacagtg ttttcaaact ttagtacaca tcagcatcac ctggaggggc tttttttaa 12405
 ataagacaca gattgctggg ctcatggtca gagttcccag ttaagtaaat caggaaattt 12465
 gtattttcta caagtttata ggtgaggcca atactgctgt tttgggaact atgctttgag 12525
 aaccactgcc ttgaaaaaat ttccaacttc tacctttaag atcagcctga cttatcaaac 12585
 gctagagaaa aactgaatct acccttgggc agatgacttg ggattggatt ctatacagca 12645
 gtcttgctca atcttcccag tttccagttt tattatacca acaattggtt tttacaagct 12705
 agaagacaat gaatgtataa gttctatgga acagtgagat aaatctaagc ttctgtctt 12765
 tgtatttaga aacattgatt ctatggatga tcatttgat catgttgacc ctttgacttg 12825
 tactgaaggt gattttaaat ttaagtatgt agtgtttgaa tttcttccat ccatgtcgtt 12885
 ttaatgagat gtttccatgt cagctccttt acagccttgg ctctggctt acagattttt 12945

ES 2 613 808 T3

gaatagttgt ttgcttgcca gttgtttttac atcttttcatt ggcacacaaa atattagcca 13005
 tttgagatga gatgagacta cttgttgtag cttcatcttt catttaattt tctggcgtaa 13065
 attaacattt taatttcata tatatctgta aagagtctac ccaaaggctt cacggaaatt 13125
 tgcaaaatga actaattccc ttttaagcag caggtgtgcc tgtttttgac ttttcagtaa 13185
 atatgttgtt tgtgcacata tctacatggt ggagaccata ttcattatth catcttccaa 13245
 ataatgggaa aaatataaaa gtgaatcagt gtgctttggg aattcagtga aatcatgtta 13305
 actcatatag agggggcctt agtttatctc ttctttactg aattaattag ttttggaat 13365
 tctttttacca ttaaaaaaaa ttaaggacca tacagagaat gatttaagaa aaaacaagtc 13425
 acttaaaaat catcacctat ttataaaactg tattaattac acataatgct tattgattca 13485
 atgaggtttc tctaaagact tctgcttaat aaatatgctg acttcattta aattagttta 13545
 gactattgta ggaatggaag gaaatgatta tatttactag aattagttag atcagaaagc 13605
 atatcagaat gttgatgata tcaaggagac aatctacaga gtttttgcct ctgtggatgg 13665
 aaataagggt gttttttttt gggttttttt ttactttagt ttcccataat ttttggaat 13725
 tatgtgtgca tttagtctt ttagtaaacac tgatttttaa attaaatttc aaaagtcaat 13785
 ctctaagagt aatttattht tgttttacca accagtgcc aaggagag gagggaatcc 13845
 aaaagccaat cttttgaacc aatgtgtaaa agattatgtt ttttcttaa gttaggagg 13905
 ctcgggccct gacactgcc gccccagtga gcatccctgg ctacctggg attatgtgca 13965
 agctgctttg tctacattt ctttcatctg gttcttattg ggagtgttc tctctaataa 14025
 aaattgattt cccacaaaat aggcaaagct gaacaaagat gaatgcttt gataagttgg 14085
 gtttcacttc agttgaaaca atgtgataga atatccagg gtggcatgat ggggcaggag 14145
 gaggtgccta gagggaaaag ttatttttgt ttcttagtgt tgtgttgtgg ggatgggaca 14205
 gataagaata agatgtttat tggcctaata atgctaagag actattatc aatatgcttt 14265
 tcccgtttt ctaaggaggaa taaacttaga caaattacat tataaacagt tcccctacta 14325
 ctatctccca ctctagataa agccagtggg tggtaggggt ctttttatc cttatagtat 14385
 tatgccaaag aatcaactta ttttcattga agattataaa taaatgaagc ttgttatagc 14445
 cataatgatt tgagtcagta taccatttta cctataaaat gcaaaattca tccttgcaac 14505
 cccattcacc aggagccttg aagcattttg ttactccaa aggccttgtc aaggaagcat 14565
 aattttttgt tttgccttct tatttagtca gtttggtcat atttacttaa aaaaacaaac 14625
 tgaaaatcac actcctttat atgttgatat aactgatttt atagaatctg tctgttcttt 14685
 gtttaacagg tctctgtaag caagcttgca agtgtattht gtgtacattt tatctgaggt 14745
 ggaaatgaaa attctaaaga gaaaatattt taaaagatat tgtatttatg ttgcttgtgt 14805
 tgtagaataa agattcaaat gcattaaaaa tctggtacat gaaacaa 14852

<210> 35

<211> 2177

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 613 808 T3

<400> 35

Met Glu Glu Ile Leu Arg Lys Leu Gln Lys Glu Ala Ser Gly Ser Lys
1 5 10 15

Tyr Lys Ala Ile Lys Glu Ser Cys Thr Trp Ala Leu Glu Thr Leu Gly
20 25 30

Gly Leu Asp Thr Ile Val Lys Ile Pro Pro His Val Leu Arg Glu Lys
35 40 45

Cys Leu Leu Pro Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu
50 55 60

Ala Gln His Ala Leu Ala Gly Met Gln Lys Leu Leu Ser Glu Glu Arg
65 70 75 80

Phe Val Ser Met Glu Thr Asp Ser Asp Glu Lys Gln Leu Leu Asn Gln
85 90 95

Ile Leu Asn Ala Val Lys Val Thr Pro Ser Leu Asn Glu Asp Leu Gln
100 105 110

Val Glu Val Met Lys Val Leu Leu Cys Ile Thr Tyr Thr Pro Thr Phe
115 120 125

Asp Leu Asn Gly Ser Ala Val Leu Lys Ile Ala Glu Val Cys Ile Glu
130 135 140

Thr Tyr Ile Ser Ser Cys His Gln Arg Ser Ile Asn Thr Ala Val Arg
145 150 155 160

Ala Thr Leu Ser Gln Met Leu Ser Asp Leu Thr Leu Gln Leu Arg Gln
165 170 175

Arg Gln Glu Asn Thr Ile Ile Glu Asn Pro Asp Val Pro Gln Asp Phe
180 185 190

Gly Asn Gln Gly Ser Thr Val Glu Ser Leu Cys Asp Asp Val Val Ser
195 200 205

Val Leu Thr Val Leu Cys Glu Lys Leu Gln Ala Ala Ile Asn Asp Ser
210 215 220

Gln Gln Leu Gln Leu Leu Tyr Leu Glu Cys Ile Leu Ser Val Leu Ser
225 230 235 240

ES 2 613 808 T3

Ser Ser Ser Ser Ser Met His Leu His Arg Arg Phe Thr Asp Leu Ile
 245 250 255
 Trp Lys Asn Leu Cys Pro Ala Leu Ile Val Ile Leu Gly Asn Pro Ile
 260 265 270
 His Asp Lys Thr Ile Thr Ser Ala His Thr Ser Ser Thr Ser Thr Ser
 275 280 285
 Leu Glu Ser Asp Ser Ala Ser Pro Gly Val Ser Asp His Gly Arg Gly
 290 295 300
 Ser Gly Cys Ser Cys Thr Ala Pro Ala Leu Ser Gly Pro Val Ala Arg
 305 310 315 320
 Thr Ile Tyr Tyr Ile Ala Ala Glu Leu Val Arg Leu Val Gly Ser Val
 325 330 335
 Asp Ser Met Lys Pro Val Leu Gln Ser Leu Tyr His Arg Val Leu Leu
 340 345 350
 Tyr Pro Pro Pro Gln His Arg Val Glu Ala Ile Lys Ile Met Lys Glu
 355 360 365
 Ile Leu Gly Ser Pro Gln Arg Leu Cys Asp Leu Ala Gly Pro Ser Ser
 370 375 380
 Thr Glu Ser Glu Ser Arg Lys Arg Ser Ile Ser Lys Arg Lys Ser His
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Leu Lys Leu Ile Met Asp Gly Met Thr Glu Ala Cys Ile
 405 410 415
 Lys Gly Gly Ile Glu Ala Cys Tyr Ala Ala Val Ser Cys Val Cys Thr
 420 425 430
 Leu Leu Gly Ala Leu Asp Glu Leu Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser Glu
 435 440 445
 Gly Gln Val Gln Leu Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Lys Asp Gly
 450 455 460
 Ala Glu Trp Ser Arg Asp Ser Met Glu Ile Asn Glu Ala Asp Phe Arg
 465 470 475 480
 Trp Gln Arg Arg Val Leu Ser Ser Glu His Thr Pro Trp Glu Ser Gly
 485 490 495

ES 2 613 808 T3

Asn Glu Arg Ser Leu Asp Ile Ser Ile Ser Val Thr Thr Asp Thr Gly
 500 505 510

Gln Thr Thr Leu Glu Gly Glu Leu Gly Gln Thr Thr Pro Glu Asp His
 515 520 525

Ser Gly Asn His Lys Asn Ser Leu Lys Ser Pro Ala Ile Pro Glu Gly
 530 535 540

Lys Glu Thr Leu Ser Lys Val Leu Glu Thr Glu Ala Val Asp Gln Pro
 545 550 555 560

Asp Val Val Gln Arg Ser His Thr Val Pro Tyr Pro Asp Ile Thr Asn
 565 570 575

Phe Leu Ser Val Asp Cys Arg Thr Arg Ser Tyr Gly Ser Arg Tyr Ser
 580 585 590

Glu Ser Asn Phe Ser Val Asp Asp Gln Asp Leu Ser Arg Thr Glu Phe
 595 600 605

Asp Ser Cys Asp Gln Tyr Ser Met Ala Ala Glu Lys Asp Ser Gly Arg
 610 615 620

Ser Asp Val Ser Asp Ile Gly Ser Asp Asn Cys Ser Leu Ala Asp Glu
 625 630 635 640

Glu Gln Thr Pro Arg Asp Cys Leu Gly His Arg Ser Leu Arg Thr Ala
 645 650 655

Ala Leu Ser Leu Lys Leu Leu Lys Asn Gln Glu Ala Asp Gln His Ser
 660 665 670

Ala Arg Leu Phe Ile Gln Ser Leu Glu Gly Leu Leu Pro Arg Leu Leu
 675 680 685

Ser Leu Ser Asn Val Glu Glu Val Asp Thr Ala Leu Gln Asn Phe Ala
 690 695 700

Ser Thr Phe Cys Ser Gly Met Met His Ser Pro Gly Phe Asp Gly Asn
 705 710 715 720

Ser Ser Leu Ser Phe Gln Met Leu Met Asn Ala Asp Ser Leu Tyr Thr
 725 730 735

Ala Ala His Cys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Lys Leu Ser His Gly Asp
 740 745 750

ES 2 613 808 T3

Tyr Tyr Arg Lys Arg Pro Thr Leu Ala Pro Gly Val Met Lys Asp Phe
 755 760 765
 Met Lys Gln Val Gln Thr Ser Gly Val Leu Met Val Phe Ser Gln Ala
 770 775 780
 Trp Ile Glu Glu Leu Tyr His Gln Val Leu Asp Arg Asn Met Leu Gly
 785 790 795 800
 Glu Ala Gly Tyr Trp Gly Ser Pro Glu Asp Asn Ser Leu Pro Leu Ile
 805 810 815
 Thr Met Leu Thr Asp Ile Asp Gly Leu Glu Ser Ser Ala Ile Gly Gly
 820 825 830
 Gln Leu Met Ala Ser Ala Ala Thr Glu Ser Pro Phe Ala Gln Ser Arg
 835 840 845
 Arg Ile Asp Asp Ser Thr Val Ala Gly Val Ala Phe Ala Arg Tyr Ile
 850 855 860
 Leu Val Gly Cys Trp Lys Asn Leu Ile Asp Thr Leu Ser Thr Pro Leu
 865 870 875 880
 Thr Gly Arg Met Ala Gly Ser Ser Lys Gly Leu Ala Phe Ile Leu Gly
 885 890 895
 Ala Glu Gly Ile Lys Glu Gln Asn Gln Lys Glu Arg Asp Ala Ile Cys
 900 905 910
 Met Ser Leu Asp Gly Leu Arg Lys Ala Ala Arg Leu Ser Cys Ala Leu
 915 920 925
 Gly Val Ala Ala Asn Cys Ala Ser Ala Leu Ala Gln Met Ala Ala Ala
 930 935 940
 Ser Cys Val Gln Glu Glu Lys Glu Glu Arg Glu Ala Gln Glu Pro Ser
 945 950 955 960
 Asp Ala Ile Thr Gln Val Lys Leu Lys Val Glu Gln Lys Leu Glu Gln
 965 970 975
 Ile Gly Lys Val Gln Gly Val Trp Leu His Thr Ala His Val Leu Cys
 980 985 990
 Met Glu Ala Ile Leu Ser Val Gly Leu Glu Met Gly Ser His Asn Pro
 995 1000 1005
 Asp Cys Trp Pro His Val Phe Arg Val Cys Glu Tyr Val Gly Thr

ES 2 613 808 T3

1010	1015	1020
Leu Glu His Asn His Phe Ser Asp Gly Ala Ser Gln Pro Pro Leu 1025 1030 1035		
Thr Ile Ser Gln Pro Gln Lys Ala Thr Gly Ser Ala Gly Leu Leu 1040 1045 1050		
Gly Asp Pro Glu Cys Glu Gly Ser Pro Pro Glu His Ser Pro Glu 1055 1060 1065		
Gln Gly Arg Ser Leu Ser Thr Ala Pro Val Val Gln Pro Leu Ser 1070 1075 1080		
Ile Gln Asp Leu Val Arg Glu Gly Ser Arg Gly Arg Ala Ser Asp 1085 1090 1095		
Phe Arg Gly Gly Ser Leu Met Ser Gly Ser Ser Ala Ala Lys Val 1100 1105 1110		
Val Leu Thr Leu Ser Thr Gln Ala Asp Arg Leu Phe Glu Asp Ala 1115 1120 1125		
Thr Asp Lys Leu Asn Leu Met Ala Leu Gly Gly Phe Leu Tyr Gln 1130 1135 1140		
Leu Lys Lys Ala Ser Gln Ser Gln Leu Phe His Ser Val Thr Asp 1145 1150 1155		
Thr Val Asp Tyr Ser Leu Ala Met Pro Gly Glu Val Lys Ser Thr 1160 1165 1170		
Gln Asp Arg Lys Ser Ala Leu His Leu Phe Arg Leu Gly Asn Ala 1175 1180 1185		
Met Leu Arg Ile Val Arg Ser Lys Ala Arg Pro Leu Leu His Val 1190 1195 1200		
Met Arg Cys Trp Ser Leu Val Ala Pro His Leu Val Glu Ala Ala 1205 1210 1215		
Cys His Lys Glu Arg His Val Ser Gln Lys Ala Val Ser Phe Ile 1220 1225 1230		
His Asp Ile Leu Thr Glu Val Leu Thr Asp Trp Asn Glu Pro Pro 1235 1240 1245		
His Phe His Phe Asn Glu Ala Leu Phe Arg Pro Phe Glu Arg Ile 1250 1255 1260		

ES 2 613 808 T3

Met	Gln	Leu	Glu	Leu	Cys	Asp	Glu	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Val	Val
1265						1270					1275			
Thr	Ser	Ile	Gly	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Cys	Ser	Thr	Gln	Ile	Gln
1280						1285					1290			
Ser	Gly	Trp	Arg	Pro	Leu	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	His	Gly
1295						1300					1305			
Gly	Asn	Lys	Ser	Glu	Met	Lys	Glu	Tyr	Leu	Val	Gly	Asp	Tyr	Ser
1310						1315					1320			
Met	Gly	Lys	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Phe	Asp	Val	Phe	Glu	Ala	Phe
1325						1330					1335			
Leu	Asn	Thr	Asp	Asn	Ile	Gln	Val	Phe	Ala	Asn	Ala	Ala	Thr	Ser
1340						1345					1350			
Tyr	Ile	Met	Cys	Leu	Met	Lys	Phe	Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Val
1355						1360					1365			
Asp	Cys	Lys	Glu	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro
1370						1375					1380			
Ser	Thr	Asp	Leu	Cys	Leu	Pro	Ala	Leu	Asp	Tyr	Leu	Arg	Arg	Cys
1385						1390					1395			
Ser	Gln	Leu	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Lys	Met	Pro	Leu	Lys	Pro	Ile
1400						1405					1410			
Phe	Leu	Ser	Gly	Arg	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Arg	Arg	Leu	Gln	Glu
1415						1420					1425			
Gln	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Asp	Gly	Ile	Glu	Ser	Val	Leu	Ser	Asp
1430						1435					1440			
Phe	Asp	Asp	Asp	Thr	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Trp	Ile	Ile	Leu	Leu
1445						1450					1455			
Glu	Gln	Leu	Thr	Ala	Ala	Val	Ser	Asn	Cys	Pro	Arg	Gln	His	Gln
1460						1465					1470			
Pro	Pro	Thr	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Val	Thr
1475						1480					1485			
Lys	Thr	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	Gly	Ile	Tyr	Ala	Val	Val	His	Leu
1490						1495					1500			

ES 2 613 808 T3

Leu	Leu	Pro	Val	Met	Ser	Val	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	His	Lys	Asp
1505						1510					1515			
His	Ser	Tyr	Trp	Asp	Met	Ala	Ser	Ala	Asn	Phe	Lys	His	Ala	Ile
1520						1525					1530			
Gly	Leu	Ser	Cys	Glu	Leu	Val	Val	Glu	His	Ile	Gln	Ser	Phe	Leu
1535						1540					1545			
His	Ser	Asp	Ile	Arg	Tyr	Glu	Ser	Met	Ile	Asn	Thr	Met	Leu	Lys
1550						1555					1560			
Asp	Leu	Phe	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Cys	Val	Ala	Lys	Pro	Thr	Glu
1565						1570					1575			
Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Gly	Cys	Ser	Cys	Ile	Arg	Tyr	Val	Leu	Val
1580						1585					1590			
Thr	Ala	Gly	Pro	Val	Phe	Thr	Glu	Glu	Met	Trp	Arg	Leu	Ala	Cys
1595						1600					1605			
Cys	Ala	Leu	Gln	Asp	Ala	Phe	Ser	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Val	Lys
1610						1615					1620			
Asp	Leu	Leu	Gly	Cys	Phe	His	Ser	Gly	Thr	Glu	Ser	Phe	Ser	Gly
1625						1630					1635			
Glu	Gly	Cys	Gln	Val	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser
1640						1645					1650			
Ala	Glu	Ala	Glu	Tyr	Trp	Arg	Ile	Arg	Ala	Met	Ala	Gln	Gln	Val
1655						1660					1665			
Phe	Met	Leu	Asp	Thr	Gln	Cys	Ser	Pro	Lys	Thr	Pro	Asn	Asn	Phe
1670						1675					1680			
Asp	His	Ala	Gln	Ser	Cys	Gln	Leu	Ile	Ile	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp
1685						1690					1695			
Glu	Lys	Pro	Asn	Gly	His	Thr	Lys	Lys	Ser	Val	Ser	Phe	Arg	Glu
1700						1705					1710			
Ile	Val	Val	Ser	Leu	Leu	Ser	His	Gln	Val	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu
1715						1720					1725			
Tyr	Asp	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Lys	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly
1730						1735					1740			

ES 2 613 808 T3

Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Gln	Val	Pro	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Gly	Phe
1745						1750					1755			
Leu	Arg	Tyr	Ile	Ser	Met	Gln	Asn	Leu	Ala	Val	Ile	Phe	Asp	Leu
1760						1765					1770			
Leu	Leu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Thr	Ala	Arg	Glu	Phe	Asp	Thr	Ser	Pro
1775						1780					1785			
Gly	Leu	Lys	Cys	Leu	Leu	Lys	Lys	Val	Ser	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala
1790						1795					1800			
Ala	Asn	Leu	Tyr	Arg	Gln	Ser	Ala	Met	Ser	Phe	Asn	Ile	Tyr	Phe
1805						1810					1815			
His	Ala	Leu	Val	Cys	Ala	Val	Leu	Thr	Asn	Gln	Glu	Thr	Ile	Thr
1820						1825					1830			
Ala	Glu	Gln	Val	Lys	Lys	Val	Leu	Phe	Glu	Asp	Asp	Glu	Arg	Ser
1835						1840					1845			
Thr	Asp	Ser	Ser	Gln	Gln	Cys	Ser	Ser	Glu	Asp	Glu	Asp	Ile	Phe
1850						1855					1860			
Glu	Glu	Thr	Ala	Gln	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Gly	Lys	Glu	Lys	Arg
1865						1870					1875			
Gln	Trp	Arg	Ala	Arg	Met	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Gln	Pro	Val	Ser
1880						1885					1890			
Asn	Ala	Asp	Trp	Val	Trp	Leu	Val	Lys	Arg	Leu	His	Lys	Leu	Cys
1895						1900					1905			
Met	Glu	Leu	Cys	Asn	Asn	Tyr	Ile	Gln	Met	His	Leu	Asp	Leu	Glu
1910						1915					1920			
Asn	Cys	Met	Glu	Glu	Pro	Pro	Ile	Phe	Lys	Gly	Asp	Pro	Phe	Phe
1925						1930					1935			
Ile	Leu	Pro	Ser	Phe	Gln	Ser	Glu	Ser	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Gly
1940						1945					1950			
Gly	Phe	Ser	Gly	Lys	Glu	Thr	Pro	Ser	Glu	Asp	Asp	Arg	Ser	Gln
1955						1960					1965			
Ser	Arg	Glu	His	Met	Gly	Glu	Ser	Leu	Ser	Leu	Lys	Ala	Gly	Gly
1970						1975					1980			
Gly	Asp	Leu	Leu	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Lys	Val	Glu	Lys	Lys	Asp

ES 2 613 808 T3

1985

1990

1995

Pro Ser Arg Lys Lys Glu Trp Trp Glu Asn Ala Gly Asn Lys Ile
2000 2005 2010

Tyr Thr Met Ala Ala Asp Lys Thr Ile Ser Lys Leu Met Thr Glu
2015 2020 2025

Tyr Lys Lys Arg Lys Gln Gln His Asn Leu Ser Ala Phe Pro Lys
2030 2035 2040

Glu Val Lys Val Glu Lys Lys Gly Glu Pro Leu Gly Pro Arg Gly
2045 2050 2055

Gln Asp Ser Pro Leu Leu Gln Arg Pro Gln His Leu Met Asp Gln
2060 2065 2070

Gly Gln Met Arg His Ser Phe Ser Ala Gly Pro Glu Leu Leu Arg
2075 2080 2085

Gln Asp Lys Arg Pro Arg Ser Gly Ser Thr Gly Ser Ser Leu Ser
2090 2095 2100

Val Ser Val Arg Asp Ala Glu Ala Gln Ile Gln Ala Trp Thr Asn
2105 2110 2115

Met Val Leu Thr Val Leu Asn Gln Ile Gln Ile Leu Pro Asp Gln
2120 2125 2130

Thr Phe Thr Ala Leu Gln Pro Ala Val Phe Pro Cys Ile Ser Gln
2135 2140 2145

Leu Thr Cys His Val Thr Asp Ile Arg Val Arg Gln Ala Val Arg
2150 2155 2160

Glu Trp Leu Gly Arg Val Gly Arg Val Tyr Asp Ile Ile Val
2165 2170 2175

<210> 36

<211> 1457

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (211)..(1110)

<400> 36

tccgtatgcg cgattcctgt gcgcgaagtt cgggtccgta gtgggctaag ggggaggggtt 60

10 tcaaagggag cgcacttccg ctgccctttc tttcgccagc cttacgggcc cgaaccctcg 120

ES 2 613 808 T3

tgtgaaggggt gcagtaccta agccggagcg gggtagaggc gggccggcac ccccttctga	180
cctccagtgc cgccggcctc aagatcagac atg gcc cag aac ttg aag gac ttg	234
Met Ala Gln Asn Leu Lys Asp Leu	
1 5	
gcg gga cgg ctg ccc gcc ggg ccc cgg ggc atg ggc acg gcc ctg aag	282
Ala Gly Arg Leu Pro Ala Gly Pro Arg Gly Met Gly Thr Ala Leu Lys	
10 15 20	
ctg ttg ctg ggg gcc ggc gcc gtg gcc tac ggt gtg cgc gaa tct gtg	330
Leu Leu Leu Gly Ala Gly Ala Val Ala Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val	
25 30 35 40	
ttc acc gtg gaa ggc ggg cac aga gcc atc ttc ttc aat cgg atc ggt	378
Phe Thr Val Glu Gly Gly His Arg Ala Ile Phe Phe Asn Arg Ile Gly	
45 50 55	
gga gtg cag cag gac act atc ctg gcc gag ggc ctt cac ttc agg atc	426
Gly Val Gln Gln Asp Thr Ile Leu Ala Glu Gly Leu His Phe Arg Ile	
60 65 70	
cct tgg ttc cag tac ccc att atc tat gac att cgg gcc aga cct cga	474
Pro Trp Phe Gln Tyr Pro Ile Ile Tyr Asp Ile Arg Ala Arg Pro Arg	
75 80 85	
aaa atc tcc tcc cct aca ggc tcc aaa gac cta cag atg gtg aat atc	522
Lys Ile Ser Ser Pro Thr Gly Ser Lys Asp Leu Gln Met Val Asn Ile	
90 95 100	
tcc ctg cga gtg ttg tct cga ccc aat gct cag gag ctt cct agc atg	570
Ser Leu Arg Val Leu Ser Arg Pro Asn Ala Gln Glu Leu Pro Ser Met	
105 110 115 120	
tac cag cgc cta ggg ctg gac tac gag gaa cga gtg ttg ccg tcc att	618
Tyr Gln Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Glu Glu Arg Val Leu Pro Ser Ile	
125 130 135	
gtc aac gag gtg ctc aag agt gtg gtg gcc aag ttc aat gcc tca cag	666
Val Asn Glu Val Leu Lys Ser Val Val Ala Lys Phe Asn Ala Ser Gln	
140 145 150	
ctg atc acc cag cgg gcc cag gta tcc ctg ttg atc cgc cgg gag ctg	714
Leu Ile Thr Gln Arg Ala Gln Val Ser Leu Leu Ile Arg Arg Glu Leu	
155 160 165	
aca gag agg gcc aag gac ttc agc ctc atc ctg gat gat gtg gcc atc	762
Thr Glu Arg Ala Lys Asp Phe Ser Leu Ile Leu Asp Asp Val Ala Ile	
170 175 180	
aca gag ctg agc ttt agc cga gag tac aca gct gct gta gaa gcc aaa	810
Thr Glu Leu Ser Phe Ser Arg Glu Tyr Thr Ala Ala Val Glu Ala Lys	
185 190 195 200	
caa gtg gcc cag cag gag gcc cag cgg gcc caa ttc ttg gta gaa aaa	858
Gln Val Ala Gln Gln Glu Ala Gln Arg Ala Gln Phe Leu Val Glu Lys	
205 210 215	
gca aag cag gaa cag cgg cag aaa att gtg cag gcc gag ggt gag gcc	906
Ala Lys Gln Glu Gln Arg Gln Lys Ile Val Gln Ala Glu Gly Glu Ala	
220 225 230	
gag gct gcc aag atg ctt gga gaa gca ctg agc aag aac cct ggc tac	954
Glu Ala Ala Lys Met Leu Gly Glu Ala Leu Ser Lys Asn Pro Gly Tyr	

ES 2 613 808 T3

	235	240	245	
	atc aaa ctt cgc aag att cga gca gcc cag aat atc tcc aag acg atc			1002
	Ile Lys Leu Arg Lys Ile Arg Ala Ala Gln Asn Ile Ser Lys Thr Ile			
	250	255	260	
	gcc aca tca cag aat cgt atc tat ctc aca gct gac aac ctt gtg ctg			1050
	Ala Thr Ser Gln Asn Arg Ile Tyr Leu Thr Ala Asp Asn Leu Val Leu			
	265	270	275	280
	aac cta cag gat gaa agt ttc acc agg gga agt gac agc ctc atc aag			1098
	Asn Leu Gln Asp Glu Ser Phe Thr Arg Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys			
	285	290	295	
	ggt aag aaa tga gcctagtcac caagaactcc acccccagag gaagtggatc			1150
	Gly Lys Lys			
	tgcttctcca gtttttgagg agccagccag gggccagca cagccctacc ccgccccagt			1210
	atcatgcgat ggtccccac accggttccc tgaaccctc ttggattaag gaagactgaa			1270
	gactagcccc ttttctgggg aattactttc ctccctccctg tgtaactgg ggctgttggg			1330
	gacagtgcgt gatttctcag tgatttccta cagtgttgtt ccctccctca aggctgggag			1390
	gagataaaca ccaaccacag aattctcaat aaatttttat tacttaacct gaaaaaaaaa			1450
	aaaaaaaa			1457
	<210> 37			
	<211> 299			
	<212> PRT			
5	<213> Homo sapiens			
	<400> 37			
	Met Ala Gln Asn Leu Lys Asp Leu Ala Gly Arg Leu Pro Ala Gly Pro			
	1 5 10 15			
	Arg Gly Met Gly Thr Ala Leu Lys Leu Leu Leu Gly Ala Gly Ala Val			
	20 25 30			
	Ala Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Phe Thr Val Glu Gly Gly His Arg			
	35 40 45			
	Ala Ile Phe Phe Asn Arg Ile Gly Gly Val Gln Gln Asp Thr Ile Leu			
	50 55 60			
	Ala Glu Gly Leu His Phe Arg Ile Pro Trp Phe Gln Tyr Pro Ile Ile			
	65 70 75 80			
	Tyr Asp Ile Arg Ala Arg Pro Arg Lys Ile Ser Ser Pro Thr Gly Ser			
	85 90 95			
	Lys Asp Leu Gln Met Val Asn Ile Ser Leu Arg Val Leu Ser Arg Pro			
	100 105 110			

ES 2 613 808 T3

Asn Ala Gln Glu Leu Pro Ser Met Tyr Gln Arg Leu Gly Leu Asp Tyr
 115 120 125
 Glu Glu Arg Val Leu Pro Ser Ile Val Asn Glu Val Leu Lys Ser Val
 130 135 140
 Val Ala Lys Phe Asn Ala Ser Gln Leu Ile Thr Gln Arg Ala Gln Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Leu Ile Arg Arg Glu Leu Thr Glu Arg Ala Lys Asp Phe Ser
 165 170 175
 Leu Ile Leu Asp Asp Val Ala Ile Thr Glu Leu Ser Phe Ser Arg Glu
 180 185 190
 Tyr Thr Ala Ala Val Glu Ala Lys Gln Val Ala Gln Gln Glu Ala Gln
 195 200 205
 Arg Ala Gln Phe Leu Val Glu Lys Ala Lys Gln Glu Gln Arg Gln Lys
 210 215 220
 Ile Val Gln Ala Glu Gly Glu Ala Glu Ala Ala Lys Met Leu Gly Glu
 225 230 235 240
 Ala Leu Ser Lys Asn Pro Gly Tyr Ile Lys Leu Arg Lys Ile Arg Ala
 245 250 255
 Ala Gln Asn Ile Ser Lys Thr Ile Ala Thr Ser Gln Asn Arg Ile Tyr
 260 265 270
 Leu Thr Ala Asp Asn Leu Val Leu Asn Leu Gln Asp Glu Ser Phe Thr
 275 280 285
 Arg Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys Gly Lys Lys
 290 295

<210> 38
 <211> 6330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (235)..(2022)

10 <400> 38
 aggagctggc ggagggcggt cgtcctggga ctgcacttgc tcccgctcggg tcgcccggct 60
 tcaccggacc cgcaggctcc cggggcaggg ccggggccag agctcgcgtg tcggcgggac 120
 atgcgctgcg tcgcctctaa cctcgggctg tgctcttttt ccaggtggcc cgccgggttc 180

ES 2 613 808 T3

tgagccttct gccctgcggg gacacggtct gcaccctgcc cgcggccacg gacc atg	237
Met	
1	
acc atg acc ctc cac acc aaa gca tct ggg atg gcc cta ctg cat cag	285
Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His Gln	
5 10 15	
atc caa ggg aac gag ctg gag ccc ctg aac cgt ccg cag ctc aag atc	333
Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys Ile	
20 25 30	
ccc ctg gag cgg ccc ctg ggc gag gtg tac ctg gac agc agc aag ccc	381
Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys Pro	
35 40 45	
gcc gtg tac aac tac ccc gag ggc gcc gcc tac gag ttc aac gcc gcg	429
Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala Ala	
50 55 60 65	
gcc gcc gcc aac gcg cag gtc tac ggt cag acc ggc ctc ccc tac ggc	477
Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr Gly	
70 75 80	
ccc ggg tct gag gct gcg gcg ttc ggc tcc aac ggc ctg ggg ggt ttc	525
Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly Phe	
85 90 95	
ccc cca ctc aac agc gtg tct ccg agc ccg ctg atg cta ctg cac ccg	573
Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His Pro	
100 105 110	
ccg ccg cag ctg tcg cct ttc ctg cag ccc cac ggc cag cag gtg ccc	621
Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val Pro	
115 120 125	
tac tac ctg gag aac gag ccc agc ggc tac acg gtg cgc gag gcc ggc	669
Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala Gly	
130 135 140 145	
ccg ccg gca ttc tac agg cca aat tca gat aat cga cgc cag ggt ggc	717
Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly Gly	
150 155 160	
aga gaa aga ttg gcc agt acc aat gac aag gga agt atg gct atg gaa	765
Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met Glu	
165 170 175	
tct gcc aag gag act cgc tac tgt gca gtg tgc aat gac tat gct tca	813
Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala Ser	
180 185 190	
ggc tac cat tat gga gtc tgg tcc tgt gag ggc tgc aag gcc ttc ttc	861
Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe Phe	
195 200 205	
aag aga agt att caa gga cat aac gac tat atg tgt cca gcc acc aac	909
Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr Asn	
210 215 220 225	
cag tgc acc att gat aaa aac agg agg aag agc tgc cag gcc tgc cgg	957
Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg	
230 235 240	

ES 2 613 808 T3

ctc cgc aaa tgc tac gaa gtg gga atg atg aaa ggt ggg ata cga aaa Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg Lys 245 250 255	1005
gac cga aga gga ggg aga atg ttg aaa cac aag cgc cag aga gat gat Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp Asp 260 265 270	1053
ggg gag ggc agg ggt gaa gtg ggg tct gct gga gac atg aga gct gcc Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala Ala 275 280 285	1101
aac ctt tgg cca agc ccg ctc atg atc aaa cgc tct aag aag aac agc Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn Ser 290 295 300 305	1149
ctg gcc ttg tcc ctg acg gcc gac cag atg gtc agt gcc ttg ttg gat Leu Ala Leu Ser Pro Ile Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu Asp 310 315 320	1197
gct gag ccc ccc ata ctc tat tcc gag tat gat cct acc aga ccc ttc Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro Phe 325 330 335	1245
agt gaa gct tgc atg atg ggc tta ctg acc aac ctg gca gac agg gag Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg Glu 340 345 350	1293
ctg gtt cac atg atc aac tgg gcg aag agg gtg cca ggc ttt gtg gat Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val Asp 355 360 365	1341
ttg acc ctc cat gat cag gtc cac ctt cta gaa tgt gcc tgg cta gag Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu Glu 370 375 380 385	1389
atc ctg atg att ggt ctc gtc tgg cgc tcc atg gag cac cca ggg aag Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly Lys 390 395 400	1437
cta ctg ttt gct cct aac ttg ctc ttg gac agg aac cag gga aaa tgt Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys Cys 405 410 415	1485
gta gag ggc atg gtg gag atc ttc gac atg ctg ctg gct aca tca tct Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser Ser 420 425 430	1533
cgg ttc cgc atg atg aat ctg cag gga gag gag ttt gtg tgc ctc aaa Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys 435 440 445	1581
tct att att ttg ctt aat tct gga gtg tac aca ttt ctg tcc agc acc Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser Thr 450 455 460 465	1629
ctg aag tct ctg gaa gag aag gac cat atc cac cga gtc ctg gac aag Leu Lys Ser Leu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp Lys 470 475 480	1677
atc aca gac act ttg atc cac ctg atg gcc aag gca ggc ctg acc ctg Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr Leu 485 490 495	1725
cag cag cag cac cag cgg ctg gcc cag ctc ctc ctc atc ctc tcc cac	1773

ES 2 613 808 T3

Gln	Gln	Gln	His	Gln	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	His	
		500					505					510				
atc	agg	cac	atg	agt	aac	aaa	ggc	atg	gag	cat	ctg	tac	agc	atg	aag	1821
Ile	Arg	His	Met	Ser	Asn	Lys	Gly	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Met	Lys	
	515					520					525					
tgc	aag	aac	gtg	gtg	ccc	ctc	tat	gac	ctg	ctg	ctg	gag	atg	ctg	gac	1869
Cys	Lys	Asn	Val	Val	Pro	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Met	Leu	Asp	
530					535					540					545	
gcc	cac	cgc	cta	cat	gcg	ccc	act	agc	cgt	gga	ggg	gca	tcc	gtg	gag	1917
Ala	His	Arg	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	
			550						555					560		
gag	acg	gac	caa	agc	cac	ttg	gcc	act	gcg	ggc	tct	act	tca	tcg	cat	1965
Glu	Thr	Asp	Gln	Ser	His	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser	His	
			565					570					575			
tcc	ttg	caa	aag	tat	tac	atc	acg	ggg	gag	gca	gag	ggt	ttc	cct	gcc	2013
Ser	Leu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Glu	Gly	Phe	Pro	Ala	
		580					585					590				
acg	gtc	tga	gagctccctg	gctccacac	ggttcagata	atccctgctg										2062
Thr	Val															
	595															
cattttaccc	tcacatgca	ccactttagc	caaattctgt	ctcctgcata	cactccggca											2122
tgcatccaac	accaatggct	ttctagatga	gtggccattc	atttgcttgc	tcagttctta											2182
gtggcacatc	ttctgtcttc	tgttggaac	agccaaagg	attccaaggc	taaatctttg											2242
taacagctct	ctttcccct	tgctatgtta	ctaagcgtga	ggattcccgt	agctcttcac											2302
agctgaactc	agtctatggg	ttggggctca	gataactctg	tgcatTTaag	ctactttag											2362
agaccaggc	ctggagagta	gacattttgc	ctctgataag	cactttttaa	atggctctaa											2422
gaataagcca	cagcaaagaa	tttaaagtgg	ctcctttaat	tggtgacttg	gagaaagcta											2482
ggtcaagggt	ttattatagc	accctcttgt	attcctatgg	caatgcatcc	ttttatgaaa											2542
gtggtacacc	ttaaagcttt	tatatgactg	tagcagagta	tctggtgatt	gtcaattcat											2602
tccccctata	ggaatacaag	gggcacacag	ggaaggcaga	tcccctagtt	ggcaagacta											2662
ttttaacttg	atacactgca	gattcagatg	tgctgaaagc	tctgcctctg	gctttccggt											2722
catgggttcc	agttaattca	tgccctccat	ggacctatgg	agagcagcaa	gttgatctta											2782
gttaagtctc	cctatatgag	ggataagttc	ctgatttttg	ttttattttt	tgtgttacaa											2842
aagaaagccc	tccctccctg	aacttgacgt	aaggtcagct	tcaggacctg	ttccagtggg											2902
cactgtactt	ggatcttccc	ggcgtgtgtg	tgcttacac	aggggtgaac	tgttcactgt											2962
ggtgatgcat	gatgagggtg	aatggtagtt	gaaaggagca	ggggccctgg	tgttgcatTT											3022
agccctgggg	catggagctg	aacagtactt	gtgcaggatt	gttgtggcta	ctagagaaca											3082
agagggaaag	tagggcagaa	actggataca	gttctgaggc	acagccagac	ttgctcaggg											3142
tggccctgcc	acaggctgca	gctacctagg	aacattcctt	gcagaccccg	cattgccctt											3202

ES 2 613 808 T3

tgggggtgcc ctgggatccc tggggtagtc cagctcttct tcatttccca gcgtggccct	3262
ggttggaaga agcagctgtc acagctgctg tagacagctg tgttcctaca attggcccag	3322
cacctgggg caccggagaa ggggtggggac cgttgctgtc actactcagg ctgactgggg	3382
cctggtcaga ttacgtatgc ccttggtggt ttagagataa tccaaaatca gggtttggtt	3442
tggggaagaa aatcctcccc ctctctcccc cgccccgttc cctaccgect ccactcctgc	3502
cagctcattt ccttcaattt cctttgacct ataggctaaa aaagaaaggc tcattccagc	3562
cacagggcag ccttccctgg gcctttgctt ctctagcaca attatgggtt acttcctttt	3622
tcttaacaaa aaagaatgtt tgatttcctc tgggtgacct tattgtctgt aattgaaacc	3682
ctattgagag gtgatgtctg tgttagccaa tgaccaggt gagctgctcg ggcttctctt	3742
ggtatgtctt gtttggaaaa gtggatttca ttcatttctg attgtccagt taagtgatca	3802
ccaaaggact gagaatctgg gagggcaaaa aaaaaaaaa agtttttatg tgcacttaaa	3862
tttggggaca attttatgta tctgtgttaa ggatatgttt aagaacataa ttcttttgtt	3922
gctgtttgtt taagaagcac cttagtttgt ttaagaagca cttatatag tataatatat	3982
atttttttga aattacattg cttgtttatc agacaattga atgtagtaat tctgttctgg	4042
atttaatttg actgggttaa catgcaaaaa ccaaggaaaa atatttagtt tttttttttt	4102
tttttgtata cttttcaagc taccttgta tgtatacagt catttatgcc taaagcctgg	4162
tgattattca tttaaatgaa gatcacattt catatcaact tttgtatcca cagtagacaa	4222
aatagcacta atccagatgc ctattgttgg atactgaatg acagacaatc ttatgtagca	4282
aagattatgc ctgaaaagga aaattattca gggcagctaa ttttgctttt accaaaatat	4342
cagtagtaat atttttgagc agtagcta at gggtcagtgg gttcttttta atgtttatac	4402
ttagattttc ttttaaaaaa attaaaataa aacaaaaaaa aatttctagg actagacgat	4462
gtaataccag ctaaagccaa acaattatac agtggaaagg tttacattat tcatccaatg	4522
tgtttctatt catgttaaga tactactaca tttgaagtgg gcagagaaca tcagatgatt	4582
gaaatgttcg cccaggggtc tccagcaact ttggaaatct ctttgtattt ttacttgaag	4642
tgccactaat ggacagcaga tattttctgg ctgatgttgg tattgggtgt aggaacatga	4702
tttaaaaaaa aactcttgcc tctgctttcc cccactctga ggcaagttaa aatgtaaaag	4762
atgtgattta tctggggggc tcaggtatgg tggggaagtg gattcaggaa tctggggaat	4822
ggcaaatata ttaagaagag tattgaaagt atttgaggga aaatgggttaa ttctgggtgt	4882
gcaccagggt tcagtagagt ccacttctgc cctggagacc acaaatcaac tagctccatt	4942
tacagccatt tctaaaatgg cagcttcagt tctagagaag aaagaacaac atcagcagta	5002
aagtccatgg aatagctagt ggtctgtgtt tcttttcgcc attgcctagc ttgccgtaat	5062
gattctataa tgccatcatg cagcaattat gagaggctag gtcatccaaa gagaagacct	5122
tatcaatgta ggttgcaaaa tctaaccctt aagggaagtgc agtctttgat ttgatttccc	5182

ES 2 613 808 T3

```

tagtaacott gcagatatgt ttaaccaagc catagcccat gccttttgag ggctgaacaa 5242
ataagggact tactgataat ttacttttga tcacattaag gtgttctcac cttgaaatct 5302
tatacactga aatggccatt gatttaggcc actggccttag agtactcctt cccctgcatg 5362
acactgatta caaatacttt cctattcata ctttccaatt atgagatgga ctgtgggtac 5422
tgaggagtgat cactaacacc atagtaatgt ctaatattca caggcagatc tgcttgggga 5482
agctagttaa gtgaaaggca aatagagtca tacagtagct caaaaggcaa ccataattct 5542
ctttggtgca ggtcttggga gcgtgatcta gattacactg caccattccc aagttaatcc 5602
cctgaaaact tactctcaac tggagcaaat gaactttggt cccaaatatc catcttttca 5662
gtagcgtaa ttatgctctg tttccaactg catttccttt ccaattgaat taaagtgtgg 5722
cctcgttttt agtcatttaa aattgttttc taagtaattg ctgcctctat tatggcactt 5782
caattttgca ctgtcttttg agattcaaga aaaatttcta ttcttttttt tgcattccat 5842
tgtgcctgaa cttttaaaat atgtaaatgc tgccatgttc caaaccatc gtcagtgtgt 5902
gtgttttagag ctgtgcaccc tagaaacaac atattgtccc atgagcaggt gcctgagaca 5962
cagaccctt tgcattcaca gagaggtcat tggttataga gacttgaatt aataagtac 6022
attatgccag tttctgttct ctcacaggtg ataaacaatg ctttttgtgc actacatact 6082
cttcagtga gagctcttgt tttatgggaa aaggctcaaa tgccaaattg tgtttgatgg 6142
attaatatgc ccttttgccg atgcatacta ttactgatgt gactcggttt tgtcgcagct 6202
ttgctttgtt taatgaaaca cacttgtaaa cctcttttgc actttgaaaa agaatccagc 6262
gggatgctcg agcacctgta aacaattttc tcaacctatt tgatgttcaa ataaagaatt 6322
aaactaaa 6330

```

<210> 39

<211> 595

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 39

```

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
1          5          10          15

```

```

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
20          25          30

```

```

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
35          40          45

```

```

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
50          55          60

```

ES 2 613 808 T3

Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr
 65 70 75 80
 Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly
 85 90 95
 Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His
 100 105 110
 Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
 115 120 125
 Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala
 130 135 140
 Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met
 165 170 175
 Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe
 195 200 205
 Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr
 210 215 220
 Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg
 245 250 255
 Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp
 260 265 270
 Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala
 275 280 285
 Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn
 290 295 300
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro

ES 2 613 808 T3

[illegible]

<210> 40
<211> 2169
<212> DNA
<213> Homo sapiens

ES 2 613 808 T3

<220>

<221> CDS

<222> (469)..(2061)

<400> 40

```

ctcgggtcttt aaaaggaaga aggggcttat cgtaaagtcg cttgtgatct tttcagtttc      60
tccagctgct ggcttttttg acaccactc ccccgccagg aggcagttgc aagcgcgagg      120
gctgcgagaa ataactgcct cttgaaactt gcagggcgaa gagcaggcgg cgagcgctgg      180
gccggggagg gaccacccga gctgcgacgg gctctggggc tgcggggcag ggctggcgcc      240
cggagcctga gctgcaggag gtgcgctcgc tttcctcaac aggtggcggc ggggcgcgcg      300
ccgggagacc cccctaatac cgggaaaagc acgtgtccgc attttagaga aggcaaggcc      360
ggtgtgttta tctgcaagcc attatacttg cccacgaatc tttgagaaca ttataatgac      420
ctttgtgcct cttcttgcaa ggtgttttct cagctgttat ctcaagac atg gat ata      477
                               Met Asp Ile
                               1

aaa aac tca cca tct agc ctt aat tct cct tcc tcc tac aac tgc agt      525
Lys Asn Ser Pro Ser Ser Leu Asn Ser Pro Ser Ser Tyr Asn Cys Ser
   5                10                15

caa tcc atc tta ccc ctg gag cac ggc tcc ata tac ata cct tcc tcc      573
Gln Ser Ile Leu Pro Leu Glu His Gly Ser Ile Tyr Ile Pro Ser Ser
  20                25                30                35

tat gta gac agc cac cat gaa tat cca gcc atg aca ttc tat agc cct      621
Tyr Val Asp Ser His His Glu Tyr Pro Ala Met Thr Phe Tyr Ser Pro
           40                45                50

gct gtg atg aat tac agc att ccc agc aat gtc act aac ttg gaa ggt      669
Ala Val Met Asn Tyr Ser Ile Pro Ser Asn Val Thr Asn Leu Glu Gly
           55                60                65

ggg cct ggt cgg cag acc aca agc cca aat gtg ttg tgg cca aca cct      717
Gly Pro Gly Arg Gln Thr Thr Ser Pro Asn Val Leu Trp Pro Thr Pro
  70                75                80

ggg cac ctt tct cct tta gtg gtc cat cgc cag tta tca cat ctg tat      765
Gly His Leu Ser Pro Leu Val Val His Arg Gln Leu Ser His Leu Tyr
  85                90                95

gcg gaa cct caa aag agt ccc tgg tgt gaa gca aga tcg cta gaa cac      813
Ala Glu Pro Gln Lys Ser Pro Trp Cys Glu Ala Arg Ser Leu Glu His
 100                105                110                115

acc tta cct gta aac aga gag aca ctg aaa agg aag gtt agt ggg aac      861
Thr Leu Pro Val Asn Arg Glu Thr Leu Lys Arg Lys Val Ser Gly Asn

```

5

ES 2 613 808 T3

120								125					130					
cgt	tgc	gcc	agc	cct	gtt	act	ggt	cca	ggt	tca	aag	agg	gat	gct	cac		909	
Arg	Cys	Ala	Ser	Pro	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	Ser	Lys	Arg	Asp	Ala	His			
			135						140					145				
ttc	tgc	gct	gtc	tgc	agc	gat	tac	gca	tcg	gga	tat	cac	tat	gga	gtc		957	
Phe	Cys	Ala	Val	Cys	Ser	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gly	Tyr	His	Tyr	Gly	Val			
			150				155						160					
tgg	tcg	tgt	gaa	gga	tgt	aag	gcc	ttt	ttt	aaa	aga	agc	att	caa	gga		1005	
Trp	Ser	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Ala	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Gln	Gly			
			165				170					175						
cat	aat	gat	tat	att	tgt	cca	gct	aca	aat	cag	tgt	aca	atc	gat	aaa		1053	
His	Asn	Asp	Tyr	Ile	Cys	Pro	Ala	Thr	Asn	Gln	Cys	Thr	Ile	Asp	Lys			
					185						190				195			
aac	cgg	cgc	aag	agc	tgc	cag	gcc	tgc	cga	ctt	cgg	aag	tgt	tac	gaa		1101	
Asn	Arg	Arg	Lys	Ser	Cys	Gln	Ala	Cys	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Tyr	Glu			
				200					205					210				
gtg	gga	atg	gtg	aag	tgt	ggc	tcc	cgg	aga	gag	aga	tgt	ggg	tac	cgc		1149	
Val	Gly	Met	Val	Lys	Cys	Gly	Ser	Arg	Arg	Glu	Arg	Cys	Gly	Tyr	Arg			
				215					220				225					
ctt	gtg	cgg	aga	cag	aga	agt	gcc	gac	gag	cag	ctg	cac	tgt	gcc	ggc		1197	
Leu	Val	Arg	Arg	Gln	Arg	Ser	Ala	Asp	Glu	Gln	Leu	His	Cys	Ala	Gly			
				230				235					240					
aag	gcc	aag	aga	agt	ggc	ggc	cac	gcg	ccc	cga	gtg	cgg	gag	ctg	ctg		1245	
Lys	Ala	Lys	Arg	Ser	Gly	Gly	His	Ala	Pro	Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Leu			
						250						255						
ctg	gac	gcc	ctg	agc	ccc	gag	cag	cta	gtg	ctc	acc	ctc	ctg	gag	gct		1293	
Leu	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Glu	Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Leu	Glu	Ala			
					265						270				275			
gag	ccg	ccc	cat	gtg	ctg	atc	agc	cgc	ccc	agt	gcg	ccc	ttc	acc	gag		1341	
Glu	Pro	Pro	His	Val	Leu	Ile	Ser	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro	Phe	Thr	Glu			
				280					285					290				
gcc	tcc	atg	atg	atg	tcc	ctg	acc	aag	ttg	gcc	gac	aag	gag	ttg	gta		1389	
Ala	Ser	Met	Met	Met	Ser	Leu	Thr	Lys	Leu	Ala	Asp	Lys	Glu	Leu	Val			
									300					305				
cac	atg	atc	agc	tgg	gcc	aag	aag	att	ccc	ggc	ttt	gtg	gag	ctc	agc		1437	
His	Met	Ile	Ser	Trp	Ala	Lys	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Val	Glu	Leu	Ser			
				310				315					320					
ctg	ttc	gac	caa	gtg	cgg	ctc	ttg	gag	agc	tgt	tgg	atg	gag	gtg	tta		1485	
Leu	Phe	Asp	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Glu	Ser	Cys	Trp	Met	Glu	Val	Leu			
						330						335						
atg	atg	ggg	ctg	atg	tgg	cgc	tca	att	gac	cac	ccc	ggc	aag	ctc	atc		1533	
Met	Met	Gly	Leu	Met	Trp	Arg	Ser	Ile	Asp	His	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile			
					345						350				355			
ttt	gct	cca	gat	ctt	gtt	ctg	gac	agg	gat	gag	ggg	aaa	tgc	gta	gaa		1581	
Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Asp	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Cys	Val	Glu			
				360					365					370				
gga	att	ctg	gaa	atc	ttt	gac	atg	ctc	ctg	gca	act	act	tca	agg	ttt		1629	
Gly	Ile	Leu	Glu	Ile	Phe	Asp	Met	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr	Ser	Arg	Phe			
			375						380					385				

ES 2 613 808 T3

cga gag tta aaa ctc caa cac aaa gaa tat ctc tgt gtc aag gcc atg 1677
 Arg Glu Leu Lys Leu Gln His Lys Glu Tyr Leu Cys Val Lys Ala Met
 390 395 400

atc ctg ctc aat tcc agt atg tac cct ctg gtc aca gcg acc cag gat 1725
 Ile Leu Leu Asn Ser Ser Met Tyr Pro Leu Val Thr Ala Thr Gln Asp
 405 410 415

gct gac agc agc cgg aag ctg gct cac ttg ctg aac gcc gtg acc gat 1773
 Ala Asp Ser Ser Arg Lys Leu Ala His Leu Leu Asn Ala Val Thr Asp
 420 425 430 435

gct ttg gtt tgg gtg att gcc aag agc ggc atc tcc tcc cag cag caa 1821
 Ala Leu Val Trp Val Ile Ala Lys Ser Gly Ile Ser Ser Gln Gln Gln
 440 445 450

tcc atg cgc ctg gct aac ctc ctg atg ctc ctg tcc cac gtc agg cat 1869
 Ser Met Arg Leu Ala Asn Leu Leu Met Leu Leu Ser His Val Arg His
 455 460 465

gcg agt aac aag ggc atg gaa cat ctg ctc aac atg aag tgc aaa aat 1917
 Ala Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Leu Asn Met Lys Cys Lys Asn
 470 475 480

gtg gtc cca gtg tat gac ctg ctg ctg gag atg ctg aat gcc cac gtg 1965
 Val Val Pro Val Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asn Ala His Val
 485 490 495

ctt cgc ggg tgc aag tcc tcc atc acg ggg tcc gag tgc agc ccg gca 2013
 Leu Arg Gly Cys Lys Ser Ser Ile Thr Gly Ser Glu Cys Ser Pro Ala
 500 505 510 515

gag gac agt aaa agc aaa gag ggc tcc cag aac cca cag tct cag tga 2061
 Glu Asp Ser Lys Ser Lys Glu Gly Ser Gln Asn Pro Gln Ser Gln
 520 525 530

cgccctggccc tgagggtgaac tggcccacag aggtcacagg ctgaagcgtg aactccagtg 2121
 tgtcaggagc ctgggcttca tctttctgct gtgtggtccc tcatttgg 2169

<210> 41
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Met Asp Ile Lys Asn Ser Pro Ser Ser Leu Asn Ser Pro Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Asn Cys Ser Gln Ser Ile Leu Pro Leu Glu His Gly Ser Ile Tyr Ile
 20 25 30

Pro Ser Ser Tyr Val Asp Ser His His Glu Tyr Pro Ala Met Thr Phe
 35 40 45

Tyr Ser Pro Ala Val Met Asn Tyr Ser Ile Pro Ser Asn Val Thr Asn
 50 55 60

ES 2 613 808 T3

Leu Glu Gly Gly Pro Gly Arg Gln Thr Thr Ser Pro Asn Val Leu Trp
 65 70 75 80
 Pro Thr Pro Gly His Leu Ser Pro Leu Val Val His Arg Gln Leu Ser
 85 90 95
 His Leu Tyr Ala Glu Pro Gln Lys Ser Pro Trp Cys Glu Ala Arg Ser
 100 105 110
 Leu Glu His Thr Leu Pro Val Asn Arg Glu Thr Leu Lys Arg Lys Val
 115 120 125
 Ser Gly Asn Arg Cys Ala Ser Pro Val Thr Gly Pro Gly Ser Lys Arg
 130 135 140
 Asp Ala His Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His
 145 150 155 160
 Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser
 165 170 175
 Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Ile Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr
 180 185 190
 Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys
 195 200 205
 Cys Tyr Glu Val Gly Met Val Lys Cys Gly Ser Arg Arg Glu Arg Cys
 210 215 220
 Gly Tyr Arg Leu Val Arg Arg Gln Arg Ser Ala Asp Glu Gln Leu His
 225 230 235 240
 Cys Ala Gly Lys Ala Lys Arg Ser Gly Gly His Ala Pro Arg Val Arg
 245 250 255
 Glu Leu Leu Leu Asp Ala Leu Ser Pro Glu Gln Leu Val Leu Thr Leu
 260 265 270
 Leu Glu Ala Glu Pro Pro His Val Leu Ile Ser Arg Pro Ser Ala Pro
 275 280 285
 Phe Thr Glu Ala Ser Met Met Met Ser Leu Thr Lys Leu Ala Asp Lys
 290 295 300
 Glu Leu Val His Met Ile Ser Trp Ala Lys Lys Ile Pro Gly Phe Val
 305 310 315 320
 Glu Leu Ser Leu Phe Asp Gln Val Arg Leu Leu Glu Ser Cys Trp Met

ES 2 613 808 T3

325	330	335
Glu Val Leu Met Met Gly Leu Met Trp Arg Ser Ile Asp His Pro Gly		
340	345	350
Lys Leu Ile Phe Ala Pro Asp Leu Val Leu Asp Arg Asp Glu Gly Lys		
355	360	365
Cys Val Glu Gly Ile Leu Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Thr		
370	375	380
Ser Arg Phe Arg Glu Leu Lys Leu Gln His Lys Glu Tyr Leu Cys Val		
385	390	395
Lys Ala Met Ile Leu Leu Asn Ser Ser Met Tyr Pro Leu Val Thr Ala		
405	410	415
Thr Gln Asp Ala Asp Ser Ser Arg Lys Leu Ala His Leu Leu Asn Ala		
420	425	430
Val Thr Asp Ala Leu Val Trp Val Ile Ala Lys Ser Gly Ile Ser Ser		
435	440	445
Gln Gln Gln Ser Met Arg Leu Ala Asn Leu Leu Met Leu Leu Ser His		
450	455	460
Val Arg His Ala Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Leu Asn Met Lys		
465	470	475
Cys Lys Asn Val Val Pro Val Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asn		
485	490	495
Ala His Val Leu Arg Gly Cys Lys Ser Ser Ile Thr Gly Ser Glu Cys		
500	505	510
Ser Pro Ala Glu Asp Ser Lys Ser Lys Glu Gly Ser Gln Asn Pro Gln		
515	520	525

Ser Gln
530

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 42

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10 <210> 43

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 43

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
20

5 <210> 44
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 44

<210> 45

<211> 18

15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 45

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

20 Leu Ala

<210> 46

<211> 16

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 46

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 47

30 <211> 5

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un péptido permeable a la membrana celular

35 <400> 47

Val Pro Met Leu Lys
1 5

<210> 48

<211> 5

40 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 48
 Pro Met Leu Lys Glu
 1 5

5 <210> 49
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 49
 Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15

Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
 20 25

<210> 50
 <211> 18
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 50
 Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 20 1 5 10 15

Ser Lys

<210> 51
 <211> 21
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 51
 Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 30 20

<210> 52
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular

<400> 52
 Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
 1 5 10 15

Gly Arg

- <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular
- <400> 53
 Ser Asp Leu Trp Glu Met Met Met Val Ser Leu Ala Cys Gln Tyr
 1 5 10 15
- 10 <210> 54
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular
- 15 <400> 54
 Thr Ser Pro Leu Asn Ile His Asn Gly Gln Lys Leu
 1 5 10
- <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular
- <400> 55
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10
- 25 <210> 56
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 30 <223> Secuencia consenso de ERE
- <400> 56
 tccagttgca ttgacctga 19
- <210> 57
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Un péptido permeable a la membrana celular
- <400> 57
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 40 1 5 10 15
- <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real
- <400> 58
 actatgtgga caggggcaag 20

<210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Un cebador para PCR a tiempo real

 <400> 59
 caggcagttg aagcagtcag 20

10 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR

15 <400> 60
 tcaaaagcta attatggggc 20

 <210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR

 <400> 61
 tcaagcgatt ctctgcctc a 21

25 <210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Un cebador para PCR

 <400> 62
 gagatccgcg gtctgtgcct g 21

 <210> 63
 <211> 21
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Un cebador para PCR

 <400> 63
 40 caggactgcg ctcaaggag g 21

 <210> 64
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Un cebador para PCR

 <400> 64
 cactggaccc cacagagttc c 21

50 <210> 65
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Un cebador para PCR

5 <400> 65
 tagttgctct cgggagggaa a 21

<210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Lys Ala Val Ser Phe
 1 5

<210> 67
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 Arg His Val Ser Gln Lys Ala Val Ser Phe Ile His Asp Ile Leu
 1 5 10 15

<210> 68
 20 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Elemento Responsable de Estrógenos

25 <400> 68
 gttcaaggcc acctggccaa cat 23

<210> 69
 <211> 23
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Elemento Responsable de Estrógenos

<400> 69
 cccaggtccc ctgccttcc taa 23

35 <210> 70
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Elemento Responsable de Estrógenos

<400> 70
 gggttcaggt ctagacctg catc 24

<210> 71
 <211> 1521
 45 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (124)..(1149)

ES 2 613 808 T3

<400> 71

```

gcgggggccgc gggccggggg cggactgggg cgggcggaag gagagccagg ccggaaggag      60

gctgccggag ggcgggagggc aggagcgggc caggagctgc tgggctggag cggcggcgcc      120

gcc atg tcc gac agc gag aag ctc aac ctg gac tcg atc atc ggg cgc      168
  Met Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser Ile Ile Gly Arg
    1             5             10             15

ctg ctg gaa ggg tcc agg gtc ctg aca ccc cat tgc gcc cca gtg cag      216
Leu Leu Glu Gly Ser Arg Val Leu Thr Pro His Cys Ala Pro Val Gln
             20             25             30

ggc tcg cgg cct ggc aag aat gta cag ctg aca gag aac gag atc cgc      264
Gly Ser Arg Pro Gly Lys Asn Val Gln Leu Thr Glu Asn Glu Ile Arg
             35             40             45

ggt ctg tgc ctg aaa tcc cgg gag att ttt ctg agc cag ccc att ctt      312
Gly Leu Cys Leu Lys Ser Arg Glu Ile Phe Leu Ser Gln Pro Ile Leu
             50             55             60

ctg gag ctg gag gca ccc ctc aag atc tgc ggt gac ata cac ggc cag      360
Leu Glu Leu Glu Ala Pro Leu Lys Ile Cys Gly Asp Ile His Gly Gln
             65             70             75

tac tac gac ctt ctg cga cta ttt gag tat ggc ggt ttc cct ccc gag      408
Tyr Tyr Asp Leu Leu Arg Leu Phe Glu Tyr Gly Gly Phe Pro Pro Glu
            80             85             90             95

agc aac tac ctc ttt ctg ggg gac tat gtg gac agg ggc aag cag tcc      456
Ser Asn Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Lys Gln Ser
             100             105             110

ttg gag acc atc tgc ctg ctg ctg gcc tat aag atc aag tac ccc gag      504
Leu Glu Thr Ile Cys Leu Leu Leu Ala Tyr Lys Ile Lys Tyr Pro Glu
             115             120             125

aac ttc ttc ctg ctc cgt ggg aac cac gag tgt gcc agc atc aac cgc      552
Asn Phe Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Ala Ser Ile Asn Arg
             130             135             140

atc tat ggt ttc tac gat gag tgc aag aga cgc tac aac atc aaa ctg      600
Ile Tyr Gly Phe Tyr Asp Glu Cys Lys Arg Arg Tyr Asn Ile Lys Leu
             145             150             155

tgg aaa acc ttc act gac tgc ttc aac tgc ctg ccc atc gcg gcc ata      648
Trp Lys Thr Phe Thr Asp Cys Phe Asn Cys Leu Pro Ile Ala Ala Ile
            160             165             170             175

gtg gac gaa aag atc ttc tgc tgc cac gga ggc ctg tcc ccg gac ctg      696
Val Asp Glu Lys Ile Phe Cys Cys His Gly Gly Leu Ser Pro Asp Leu

```

ES 2 613 808 T3

	180	185	190	
cag tct atg gag cag att cgg cgg atc atg cgg ccc aca gat gtg cct				744
Gln Ser Met Glu Gln Ile Arg Arg Ile Met Arg Pro Thr Asp Val Pro				
	195	200	205	
gac cag ggc ctg ctg tgt gac ctg ctg tgg tct gac cct gac aag gac				792
Asp Gln Gly Leu Leu Cys Asp Leu Leu Trp Ser Asp Pro Asp Lys Asp				
	210	215	220	
gtg cag ggc tgg ggc gag aac gac cgt ggc gtc tct ttt acc ttt gga				840
Val Gln Gly Trp Gly Glu Asn Asp Arg Gly Val Ser Phe Thr Phe Gly				
	225	230	235	
gcc gag gtg gtg gcc aag ttc ctc cac aag cac gac ttg gac ctc atc				888
Ala Glu Val Val Ala Lys Phe Leu His Lys His Asp Leu Asp Leu Ile				
	240	245	250	255
tgc cga gca cac cag gtg gta gaa gac ggc tac gag ttc ttt gcc aag				936
Cys Arg Ala His Gln Val Val Glu Asp Gly Tyr Glu Phe Phe Ala Lys				
	260	265	270	
cgg cag ctg gtg aca ctt ttc tca gct ccc aac tac tgt ggc gag ttt				984
Arg Gln Leu Val Thr Leu Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Cys Gly Glu Phe				
	275	280	285	
gac aat gct ggc gcc atg atg agt gtg gac gag acc ctc atg tgc tct				1032
Asp Asn Ala Gly Ala Met Met Ser Val Asp Glu Thr Leu Met Cys Ser				
	290	295	300	
ttc cag atc ctc aag ccc gcc gac aag aac aag ggg aag tac ggg cag				1080
Phe Gln Ile Leu Lys Pro Ala Asp Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Gly Gln				
	305	310	315	
ttc agt ggc ctg aac cct gga ggc cga ccc atc acc cca ccc cgc aat				1128
Phe Ser Gly Leu Asn Pro Gly Gly Arg Pro Ile Thr Pro Pro Arg Asn				
	320	325	330	335
tcc gcc aaa gcc aag aaa tag ccccccgcaca ccaccctgtg ccccagatga				1179
Ser Ala Lys Ala Lys Lys				
	340			
tggattgatt gtacagaaat catgctgccat tgctgggggg gggtcacccc gacccctcag				1239
gcccacctgt cacggggaac atggagcctt ggtgtatattt tcttttcttt ttttaatgaa				1299
tcaatagcag cgtccagtc cccagggctg cttcctgcct gcacctgcg tgactgtgag				1359
caggatcctg gggccgaggc tgcagctcag ggcaacggca ggccaggtcg tgggtctcca				1419
gccgtgcttg gcctcagggc tggcagccgg atcctggggc aaccatctg gtctcttgaa				1479
taaaggtcaa agctggattc tcgcaaaaaa aaaaaaaaaa aa				1521

<210> 72

<211> 341

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Met	Ser	Asp	Ser	Glu	Lys	Leu	Asn	Leu	Asp	Ser	Ile	Ile	Gly	Arg	Leu
1				5				10					15		

ES 2 613 808 T3

Leu Glu Gly Ser Arg Val Leu Thr Pro His Cys Ala Pro Val Gln Gly
 20 25 30
 Ser Arg Pro Gly Lys Asn Val Gln Leu Thr Glu Asn Glu Ile Arg Gly
 35 40 45
 Leu Cys Leu Lys Ser Arg Glu Ile Phe Leu Ser Gln Pro Ile Leu Leu
 50 55 60
 Glu Leu Glu Ala Pro Leu Lys Ile Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Asp Leu Leu Arg Leu Phe Glu Tyr Gly Gly Phe Pro Pro Glu Ser
 85 90 95
 Asn Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Lys Gln Ser Leu
 100 105 110
 Glu Thr Ile Cys Leu Leu Leu Ala Tyr Lys Ile Lys Tyr Pro Glu Asn
 115 120 125
 Phe Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Ala Ser Ile Asn Arg Ile
 130 135 140
 Tyr Gly Phe Tyr Asp Glu Cys Lys Arg Arg Tyr Asn Ile Lys Leu Trp
 145 150 155 160
 Lys Thr Phe Thr Asp Cys Phe Asn Cys Leu Pro Ile Ala Ala Ile Val
 165 170 175
 Asp Glu Lys Ile Phe Cys Cys His Gly Gly Leu Ser Pro Asp Leu Gln
 180 185 190
 Ser Met Glu Gln Ile Arg Arg Ile Met Arg Pro Thr Asp Val Pro Asp
 195 200 205
 Gln Gly Leu Leu Cys Asp Leu Leu Trp Ser Asp Pro Asp Lys Asp Val
 210 215 220
 Gln Gly Trp Gly Glu Asn Asp Arg Gly Val Ser Phe Thr Phe Gly Ala
 225 230 235 240
 Glu Val Val Ala Lys Phe Leu His Lys His Asp Leu Asp Leu Ile Cys
 245 250 255
 Arg Ala His Gln Val Val Glu Asp Gly Tyr Glu Phe Phe Ala Lys Arg
 260 265 270

Gln Leu Val Thr Leu Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Cys Gly Glu Phe Asp
275 280 285

Asn Ala Gly Ala Met Met Ser Val Asp Glu Thr Leu Met Cys Ser Phe
290 295 300

Gln Ile Leu Lys Pro Ala Asp Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Gly Gln Phe
305 310 315 320

Ser Gly Leu Asn Pro Gly Gly Arg Pro Ile Thr Pro Pro Arg Asn Ser
325 330 335

Ala Lys Ala Lys Lys
340

<210> 73

<211> 1488

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (124)..(1116)

<400> 73

gcggggccgc gggccggggg cggactgggg cgggcggaag gagagccagg ccggaaggag 60

gctgccggag ggcgggagggc aggagcgggc caggagctgc tgggctggag cggcggcgcc 120

gcc atg tcc gac agc gag aag ctc aac ctg gac tcg atc atc ggg cgc 168
Met Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser Ile Ile Gly Arg
1 5 10 15

ctg ctg gaa gtg cag ggc tcg cgg cct ggc aag aat gta cag ctg aca 216
Leu Leu Glu Val Gln Gly Ser Arg Pro Gly Lys Asn Val Gln Leu Thr
20 25 30

gag aac gag atc cgc ggt ctg tgc ctg aaa tcc cgg gag att ttt ctg 264
Glu Asn Glu Ile Arg Gly Leu Cys Leu Lys Ser Arg Glu Ile Phe Leu
35 40 45

agc cag ccc att ctt ctg gag ctg gag gca ccc ctc aag atc tgc ggt 312
Ser Gln Pro Ile Leu Leu Glu Leu Glu Ala Pro Leu Lys Ile Cys Gly
50 55 60

gac ata cac ggc cag tac tac gac ctt ctg cga cta ttt gag tat ggc 360
Asp Ile His Gly Gln Tyr Tyr Asp Leu Leu Arg Leu Phe Glu Tyr Gly
65 70 75

ggt ttc cct ccc gag agc aac tac ctc ttt ctg ggg gac tat gtg gac 408
Gly Phe Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp
80 85 90 95

agg ggc aag cag tcc ttg gag acc atc tgc ctg ctg ctg gcc tat aag 456
Arg Gly Lys Gln Ser Leu Glu Thr Ile Cys Leu Leu Leu Ala Tyr Lys
100 105 110

10 atc aag tac ccc gag aac ttc ttc ctg ctc cgt ggg aac cac gag tgt 504
Ile Lys Tyr Pro Glu Asn Phe Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys

ES 2 613 808 T3

115	120	125	
gcc agc atc aac cgc atc tat ggt ttc tac gat gag tgc aag aga cgc Ala Ser Ile Asn Arg Ile Tyr Gly Phe Tyr Asp Glu Cys Lys Arg Arg 130 135 140			552
tac aac atc aaa ctg tgg aaa acc ttc act gac tgc ttc aac tgc ctg Tyr Asn Ile Lys Leu Trp Lys Thr Phe Thr Asp Cys Phe Asn Cys Leu 145 150 155			600
ccc atc gcg gcc ata gtg gac gaa aag atc ttc tgc tgc cac gga ggc Pro Ile Ala Ala Ile Val Asp Glu Lys Ile Phe Cys Cys His Gly Gly 160 165 170 175			648
ctg tcc ccg gac ctg cag tct atg gag cag att cgg cgg atc atg cgg Leu Ser Pro Asp Leu Gln Ser Met Glu Gln Ile Arg Arg Ile Met Arg 180 185 190			696
ccc aca gat gtg cct gac cag ggc ctg ctg tgt gac ctg ctg tgg tct Pro Thr Asp Val Pro Asp Gln Gly Leu Leu Cys Asp Leu Leu Trp Ser 195 200 205			744
gac cct gac aag gac gtg cag ggc tgg ggc gag aac gac cgt ggc gtc Asp Pro Asp Lys Asp Val Gln Gly Trp Gly Glu Asn Asp Arg Gly Val 210 215 220			792
tct ttt acc ttt gga gcc gag gtg gtg gcc aag ttc ctc cac aag cac Ser Phe Thr Phe Gly Ala Glu Val Val Ala Lys Phe Leu His Lys His 225 230 235			840
gac ttg gac ctc atc tgc cga gca cac cag gtg gta gaa gac ggc tac Asp Leu Asp Leu Ile Cys Arg Ala His Gln Val Val Glu Asp Gly Tyr 240 245 250 255			888
gag ttc ttt gcc aag cgg cag ctg gtg aca ctt ttc tca gct ccc aac Glu Phe Phe Ala Lys Arg Gln Leu Val Thr Leu Phe Ser Ala Pro Asn 260 265 270			936
tac tgt ggc gag ttt gac aat gct ggc gcc atg atg agt gtg gac gag Tyr Cys Gly Glu Phe Asp Asn Ala Gly Ala Met Met Ser Val Asp Glu 275 280 285			984
acc ctc atg tgc tct ttc cag atc ctc aag ccc gcc gac aag aac aag Thr Leu Met Cys Ser Phe Gln Ile Leu Lys Pro Ala Asp Lys Asn Lys 290 295 300			1032
ggg aag tac ggg cag ttc agt ggc ctg aac cct gga ggc cga ccc atc Gly Lys Tyr Gly Gln Phe Ser Gly Leu Asn Pro Gly Gly Arg Pro Ile 305 310 315			1080
acc cca ccc cgc aat tcc gcc aaa gcc aag aaa tag ccccccacaca Thr Pro Pro Arg Asn Ser Ala Lys Ala Lys Lys 320 325 330			1126
ccaccctgtg cccagatga tggattgatt gtacagaaat catgctgccca tgctgggggg			1186
gggtcacccc gaccctcag gccacctgt cacggggaac atggagcctt ggtgtatattt			1246
tcttttcttt ttttaatgaa tcaatagcag cgtccagtcc cccagggtg cttcctgcct			1306
gcacctgcgg tgactgtgag caggatcctg gggccgaggc tgcagctcag ggcaacggca			1366
ggccaggctg tgggtctcca gccgtgcttg gcctcagggc tggcagccgg atcctggggc			1426
aaccatctg gtctcttgaa taaaggtcaa agctggattc tcgcaaaaaa aaaaaaaaaa			1486
aa			1488

<210> 74
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 613 808 T3

<400> 74

```

Met Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser Ile Ile Gly Arg Leu
1          5          10          15

Leu Glu Val Gln Gly Ser Arg Pro Gly Lys Asn Val Gln Leu Thr Glu
          20          25          30

Asn Glu Ile Arg Gly Leu Cys Leu Lys Ser Arg Glu Ile Phe Leu Ser
          35          40          45

Gln Pro Ile Leu Leu Glu Leu Glu Ala Pro Leu Lys Ile Cys Gly Asp
          50          55          60

Ile His Gly Gln Tyr Tyr Asp Leu Leu Arg Leu Phe Glu Tyr Gly Gly
65          70          75          80

Phe Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg
          85          90          95

Gly Lys Gln Ser Leu Glu Thr Ile Cys Leu Leu Leu Ala Tyr Lys Ile
          100          105          110

Lys Tyr Pro Glu Asn Phe Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Ala
          115          120          125

Ser Ile Asn Arg Ile Tyr Gly Phe Tyr Asp Glu Cys Lys Arg Arg Tyr
          130          135          140

Asn Ile Lys Leu Trp Lys Thr Phe Thr Asp Cys Phe Asn Cys Leu Pro
145          150          155          160

Ile Ala Ala Ile Val Asp Glu Lys Ile Phe Cys Cys His Gly Gly Leu
          165          170          175

Ser Pro Asp Leu Gln Ser Met Glu Gln Ile Arg Arg Ile Met Arg Pro
          180          185          190

Thr Asp Val Pro Asp Gln Gly Leu Leu Cys Asp Leu Leu Trp Ser Asp
          195          200          205

Pro Asp Lys Asp Val Gln Gly Trp Gly Glu Asn Asp Arg Gly Val Ser
210          215          220

```

ES 2 613 808 T3

Phe Thr Phe Gly Ala Glu Val Val Ala Lys Phe Leu His Lys His Asp
 225 230 235 240

Leu Asp Leu Ile Cys Arg Ala His Gln Val Val Glu Asp Gly Tyr Glu
 245 250 255

Phe Phe Ala Lys Arg Gln Leu Val Thr Leu Phe Ser Ala Pro Asn Tyr
 260 265 270

Cys Gly Glu Phe Asp Asn Ala Gly Ala Met Met Ser Val Asp Glu Thr
 275 280 285

Leu Met Cys Ser Phe Gln Ile Leu Lys Pro Ala Asp Lys Asn Lys Gly
 290 295 300

Lys Tyr Gly Gln Phe Ser Gly Leu Asn Pro Gly Gly Arg Pro Ile Thr
 305 310 315 320

Pro Pro Arg Asn Ser Ala Lys Ala Lys Lys
 325 330

<210> 75
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (124)..(984)

5 <400> 75
 gcggggccgc gggccggggg cggactgggg cgggcggaag gagagccagg ccggaaggag 60

gctgccggag ggcgggagggc aggagcgggc caggagctgc tgggctggag cggcggcgcc 120

gcc atg tcc gac agc gag aag ctc aac ctg gac tcg atc atc ggg cgc 168
 Met Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser Ile Ile Gly Arg
 1 5 10 15

ctg ctg gaa ggt gac ata cac ggc cag tac tac gac ctt ctg cga cta 216
 Leu Leu Glu Gly Asp Ile His Gly Gln Tyr Tyr Asp Leu Leu Arg Leu
 20 25 30

ttt gag tat ggc ggt ttc cct ccc gag agc aac tac ctc ttt ctg ggg 264
 Phe Glu Tyr Gly Gly Phe Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Leu Phe Leu Gly
 35 40 45

gac tat gtg gac agg ggc aag cag tcc ttg gag acc atc tgc ctg ctg 312
 Asp Tyr Val Asp Arg Gly Lys Gln Ser Leu Glu Thr Ile Cys Leu Leu
 50 55 60

ctg gcc tat aag atc aag tac ccc gag aac ttc ttc ctg ctc cgt ggg 360
 Leu Ala Tyr Lys Ile Lys Tyr Pro Glu Asn Phe Phe Leu Leu Arg Gly
 65 70 75

ES 2 613 808 T3

```

aac cac gag tgt gcc agc atc aac cgc atc tat ggt ttc tac gat gag      408
Asn His Glu Cys Ala Ser Ile Asn Arg Ile Tyr Gly Phe Tyr Asp Glu
80                               85                               90                               95

tgc aag aga cgc tac aac atc aaa ctg tgg aaa acc ttc act gac tgc      456
Cys Lys Arg Arg Tyr Asn Ile Lys Leu Trp Lys Thr Phe Thr Asp Cys
                               100                               105                               110

ttc aac tgc ctg ccc atc gcg gcc ata gtg gac gaa aag atc ttc tgc      504
Phe Asn Cys Leu Pro Ile Ala Ala Ile Val Asp Glu Lys Ile Phe Cys
                               115                               120                               125

tgc cac gga ggc ctg tcc ccg gac ctg cag tct atg gag cag att cgg      552
Cys His Gly Gly Leu Ser Pro Asp Leu Gln Ser Met Glu Gln Ile Arg
                               130                               135                               140

cgg atc atg cgg ccc aca gat gtg cct gac cag ggc ctg ctg tgt gac      600
Arg Ile Met Arg Pro Thr Asp Val Pro Asp Gln Gly Leu Leu Cys Asp
                               145                               150                               155

ctg ctg tgg tct gac cct gac aag gac gtg cag ggc tgg ggc gag aac      648
Leu Leu Trp Ser Asp Pro Asp Lys Asp Val Gln Gly Trp Gly Glu Asn
160                               165                               170                               175

gac cgt ggc gtc tct ttt acc ttt gga gcc gag gtg gtg gcc aag ttc      696
Asp Arg Gly Val Ser Phe Thr Phe Gly Ala Glu Val Val Ala Lys Phe
                               180                               185                               190

ctc cac aag cac gac ttg gac ctc atc tgc cga gca cac cag gtg gta      744
Leu His Lys His Asp Leu Asp Leu Ile Cys Arg Ala His Gln Val Val
                               195                               200                               205

gaa gac ggc tac gag ttc ttt gcc aag cgg cag ctg gtg aca ctt ttc      792
Glu Asp Gly Tyr Glu Phe Phe Ala Lys Arg Gln Leu Val Thr Leu Phe
                               210                               215                               220

tca gct ccc aac tac tgt ggc gag ttt gac aat gct ggc gcc atg atg      840
Ser Ala Pro Asn Tyr Cys Gly Glu Phe Asp Asn Ala Gly Ala Met Met
                               225                               230                               235

agt gtg gac gag acc ctc atg tgc tct ttc cag atc ctc aag ccc gcc      888
Ser Val Asp Glu Thr Leu Met Cys Ser Phe Gln Ile Leu Lys Pro Ala
240                               245                               250                               255

gac aag aac aag ggg aag tac ggg cag ttc agt ggc ctg aac cct gga      936
Asp Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Gly Gln Phe Ser Gly Leu Asn Pro Gly
                               260                               265                               270

ggc cga ccc atc acc cca ccc cgc aat tcc gcc aaa gcc aag aaa tag      984
Gly Arg Pro Ile Thr Pro Pro Arg Asn Ser Ala Lys Ala Lys Lys
                               275                               280                               285

ccccgcaca ccacctgtg cccagatga tggattgatt gtacagaaat catgctgcca 1044

tgctgggggg gggtcacccc gacccctcag gccacctgt cacggggaac atggagcctt 1104

ggtgtatttt tcttttcttt ttttaatgaa tcaatagcag cgtccagtcc cccagggtg 1164

cttcctgcct gcacctgcgg tgactgtgag caggatcctg gggccgaggc tgcagctcag 1224

ggcaacggca ggccaggtcg tgggtctcca gccgtgcttg gcctcagggc tggcagccgg 1284

atcctggggc aaccatctg gtctcttgaa taaaggtcaa agctggattc tcgcaaaaaa 1344

aaaaaaaaaa aa 1356

<210> 76
<211> 286
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

ES 2 613 808 T3

<400> 76

Met Ser Asp Ser Glu Lys Leu Asn Leu Asp Ser Ile Ile Gly Arg Leu
1 5 10 15

Leu Glu Gly Asp Ile His Gly Gln Tyr Tyr Asp Leu Leu Arg Leu Phe
20 25 30

Glu Tyr Gly Gly Phe Pro Pro Glu Ser Asn Tyr Leu Phe Leu Gly Asp
35 40 45

Tyr Val Asp Arg Gly Lys Gln Ser Leu Glu Thr Ile Cys Leu Leu Leu
50 55 60

Ala Tyr Lys Ile Lys Tyr Pro Glu Asn Phe Phe Leu Leu Arg Gly Asn
65 70 75 80

His Glu Cys Ala Ser Ile Asn Arg Ile Tyr Gly Phe Tyr Asp Glu Cys
85 90 95

Lys Arg Arg Tyr Asn Ile Lys Leu Trp Lys Thr Phe Thr Asp Cys Phe
100 105 110

Asn Cys Leu Pro Ile Ala Ala Ile Val Asp Glu Lys Ile Phe Cys Cys
115 120 125

His Gly Gly Leu Ser Pro Asp Leu Gln Ser Met Glu Gln Ile Arg Arg
130 135 140

Ile Met Arg Pro Thr Asp Val Pro Asp Gln Gly Leu Leu Cys Asp Leu
145 150 155 160

Leu Trp Ser Asp Pro Asp Lys Asp Val Gln Gly Trp Gly Glu Asn Asp
165 170 175

Arg Gly Val Ser Phe Thr Phe Gly Ala Glu Val Val Ala Lys Phe Leu
180 185 190

His Lys His Asp Leu Asp Leu Ile Cys Arg Ala His Gln Val Val Glu
195 200 205

Asp Gly Tyr Glu Phe Phe Ala Lys Arg Gln Leu Val Thr Leu Phe Ser
210 215 220

Ala Pro Asn Tyr Cys Gly Glu Phe Asp Asn Ala Gly Ala Met Met Ser
225 230 235 240

Val Asp Glu Thr Leu Met Cys Ser Phe Gln Ile Leu Lys Pro Ala Asp
245 250 255

Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Gly Gln Phe Ser Gly Leu Asn Pro Gly Gly
260 265 270

Arg Pro Ile Thr Pro Pro Arg Asn Ser Ala Lys Ala Lys Lys
275 280 285

<210> 77
 <211> 2689
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (201)..(1256)

```

<400> 77
gatcttgggc tgaggttccc gggcgggacgg gcgcggagag acgcgggaag caggggctgg      60
gcggggggtcg cgcgcccgca gctagcgtag ccagcccgag ggccgcccgc gccgcccgcc      120
agcgcgctcc ggggcccgcg gccgcagcca gcacccgcg cgccgcagct ccgggaccgg      180
ccccggccgc cgccgcccgc atg ggc aac gcc gcc gcc gcc aag aag ggc agc      233
                        Met Gly Asn Ala Ala Ala Ala Lys Lys Gly Ser
                        1                        5                        10

gag cag gag agc gtg aaa gaa ttc tta gcc aaa gcc aaa gaa gat ttt      281
Glu Gln Glu Ser Val Lys Glu Phe Leu Ala Lys Ala Lys Glu Asp Phe
                        15                        20                        25

ctt aaa aaa tgg gaa agt ccc gct cag aac aca gcc cac ttg gat cag      329
Leu Lys Lys Trp Glu Ser Pro Ala Gln Asn Thr Ala His Leu Asp Gln
                        30                        35                        40

ttt gaa cga atc aag acc ctc ggc acg ggc tcc ttc ggg cgg gtg atg      377
Phe Glu Arg Ile Lys Thr Leu Gly Thr Gly Ser Phe Gly Arg Val Met
                        45                        50                        55

ctg gtg aaa cac aag gag acc ggg aac cac tat gcc atg aag atc ctc      425
Leu Val Lys His Lys Glu Thr Gly Asn His Tyr Ala Met Lys Ile Leu
                        60                        65                        70                        75

gac aaa cag aag gtg gtg aaa ctg aaa cag atc gaa cac acc ctg aat      473
Asp Lys Gln Lys Val Val Lys Leu Lys Gln Ile Glu His Thr Leu Asn
                        80                        85                        90

gaa aag cgc atc ctg caa gct gtc aac ttt ccg ttc ctc gtc aaa ctc      521
Glu Lys Arg Ile Leu Gln Ala Val Asn Phe Pro Phe Leu Val Lys Leu
                        95                        100                        105

gag ttc tcc ttc aag gac aac tca aac tta tac atg gtc atg gag tac      569
Glu Phe Ser Phe Lys Asp Asn Ser Asn Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr
                        110                        115                        120
    
```

10

ES 2 613 808 T3

gtg ccc ggc ggg gag atg ttc tca cac cta cgg cgg atc gga agg ttc Val Pro Gly Gly Glu Met Phe Ser His Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe 125 130 135	617
agt gag ccc cat gcc cgt ttc tac gcg gcc cag atc gtc ctg acc ttt Ser Glu Pro His Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Gln Ile Val Leu Thr Phe 140 145 150 155	665
gag tat ctg cac tcg ctg gat ctc atc tac agg gac ctg aag ccg gag Glu Tyr Leu His Ser Leu Asp Leu Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu 160 165 170	713
aat ctg ctc att gac cag cag ggc tac att cag gtg aca gac ttc ggt Asn Leu Leu Ile Asp Gln Gln Gly Thr Ile Gln Val Thr Asp Phe Gly 175 180 185	761
ttc gcc aag cgc gtg aag ggc cgc act tgg acc ttg tgc gcc acc cct Phe Ala Lys Arg Val Lys Gly Arg Thr Trp Thr Leu Cys Gly Thr Pro 190 195 200	809
gag tac ctg gcc cct gag att atc ctg agc aaa ggc tac aac aag gcc Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Ile Ile Leu Ser Lys Gly Tyr Asn Lys Ala 205 210 215	857
gtg gac tgg tgg gcc ctg ggg gtt ctt atc tat gaa atg gcc gct ggc Val Asp Trp Trp Ala Leu Gly Val Leu Ile Tyr Glu Met Ala Ala Gly 220 225 230 235	905
tac ccg ccc ttc ttc gca gac cag ccc atc cag atc tat gag aag atc Tyr Pro Pro Phe Phe Ala Asp Gln Pro Ile Gln Ile Tyr Glu Lys Ile 240 245 250	953
gtc tct ggg aag gtg cgc ttc cct tcc cac ttc agc tct gac ttg aag Val Ser Gly Lys Val Arg Phe Pro Ser His Phe Ser Ser Asp Leu Lys 255 260 265	1001
gac ctg ctg cgg aac ctc ctg cag gta gat ctc acc aag cgc ttt ggg Asp Leu Leu Arg Asn Leu Leu Gln Val Asp Leu Thr Lys Arg Phe Gly 270 275 280	1049
aac ctc aag aat ggg gtc aac gat atc aag aac cac aag tgg ttt gcc Asn Leu Lys Asn Gly Val Asn Asp Ile Lys Asn His Lys Trp Phe Ala 285 290 295	1097
aca act gac tgg att gcc atc tac cag agg aag gtg gaa gct ccc ttc Thr Thr Asp Trp Ile Ala Ile Tyr Gln Arg Lys Val Glu Ala Pro Phe 300 305 310 315	1145
ata cca aag ttt aaa ggc cct ggg gat acg agt aac ttt gac gac tat Ile Pro Lys Phe Lys Gly Pro Gly Asp Thr Ser Asn Phe Asp Asp Tyr 320 325 330	1193
gag gaa gaa gaa atc cgg gtc tcc atc aat gag aag tgt gcc aag gag Glu Glu Glu Glu Ile Arg Val Ser Ile Asn Glu Lys Cys Gly Lys Glu 335 340 345	1241
ttt tct gag ttt tag gggcatgcct gtgcccccat gggttttctt ttttctttt Phe Ser Glu Phe 350	1296
tctttttttt ggtcgggggg gtgggagggg tggattgaac agccagaggg ccccagagtt	1356
ccttgcatct aatttcaccc ccacccaccc ctccaggggt aggggggagca ggaagcccag	1416
ataatcagag ggacagaaac accagctgct cccctcatc cccttcaccc tctgcccc	1476

ES 2 613 808 T3

```

tctcccaactt ttcccttcct ctttccccac agccccccag cccctcagcc ctcccagccc 1536
acttctgcct gttttaaacg agtttctcaa ctccagtcag accaggtctt gctggtgtat 1596
ccagggacag ggtatggaaa gaggggctca cgcttaactc cagccccccac ccacaccccc 1656
atccccacca accacaggcc ccacttgcta agggcaaatg aacgaagcgc caaccttcct 1716
ttcggagtaa tcctgcctgg gaaggagaga tttttagtga catgttcagt gggttgcttg 1776
ctagaatttt tttaaaaaaa caacaattta aaatcttatt taagtccac cagtgcctcc 1836
ctccctcctt cctctactcc caccctccc atgtccccc attcctcaa tccattttaa 1896
agagaagcag actgactttg gaaagggagg cgctgggggt tgaacctccc cgctgctaata 1956
ctcccctggg cccctccccg gggaatcctc tctgccaatc ctgcgaggggt ctaggccctt 2016
ttaggaagcc tccgctctct ttttcccaa cagacctgtc ttcacccttg ggctttgaaa 2076
gccagacaaa gcagctgccc ctctccctgc caaagaggag tcatcccca aaaagacaga 2136
gggggagccc caagcccaag tctttcctcc cagcagcgtt tcccccaac tccttaattt 2196
tattctccgc tagattttaa cgtccagcct tccctcagct gagtggggag ggcacccctg 2256
caaaaggga cagaagaggc caagtcccc caagccacgg cccgggggtt aaggctagag 2316
ctgctgggga ggggctgcct gttttactca cccaccagct tccgcctccc ccatcctggg 2376
cgccctcct ccagcttagc tgtcagctgt ccacacctc tccccactt tctcatttgt 2436
gcttttttct ctcgtaatag aaaagtggg agccgctggg gagccacccc attcatcccc 2496
gtatttcccc ctctcataac ttctccccat cccaggagga gttctcaggc ctgggggtggg 2556
gccccgggtg ggtgcggggg cgattcaacc tgtgtgctgc gaaggacgag acttcctctt 2616
gaacagtgtg ctgttgtaaa catatttgaa aactattacc aataaagttt tgtttaaaaa 2676
aaaaaaaaaaa aaa 2689

```

<210> 78
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 78
Met Gly Asn Ala Ala Ala Ala Lys Lys Gly Ser Glu Gln Glu Ser Val
1          5          10         15

Lys Glu Phe Leu Ala Lys Ala Lys Glu Asp Phe Leu Lys Lys Trp Glu
          20          25          30

Ser Pro Ala Gln Asn Thr Ala His Leu Asp Gln Phe Glu Arg Ile Lys
          35          40          45

Thr Leu Gly Thr Gly Ser Phe Gly Arg Val Met Leu Val Lys His Lys
          50          55          60

```

ES 2 613 808 T3

Glu Thr Gly Asn His Tyr Ala Met Lys Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val
 65 70 75 80
 Val Lys Leu Lys Gln Ile Glu His Thr Leu Asn Glu Lys Arg Ile Leu
 85 90 95
 Gln Ala Val Asn Phe Pro Phe Leu Val Lys Leu Glu Phe Ser Phe Lys
 100 105 110
 Asp Asn Ser Asn Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Val Pro Gly Gly Glu
 115 120 125
 Met Phe Ser His Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Ser Glu Pro His Ala
 130 135 140
 Arg Phe Tyr Ala Ala Gln Ile Val Leu Thr Phe Glu Tyr Leu His Ser
 145 150 155 160
 Leu Asp Leu Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Asp
 165 170 175
 Gln Gln Gly Tyr Ile Gln Val Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys Arg Val
 180 185 190
 Lys Gly Arg Thr Trp Thr Leu Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro
 195 200 205
 Glu Ile Ile Leu Ser Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Val Asp Trp Trp Ala
 210 215 220
 Leu Gly Val Leu Ile Tyr Glu Met Ala Ala Gly Tyr Pro Pro Phe Phe
 225 230 235 240
 Ala Asp Gln Pro Ile Gln Ile Tyr Glu Lys Ile Val Ser Gly Lys Val
 245 250 255
 Arg Phe Pro Ser His Phe Ser Ser Asp Leu Lys Asp Leu Leu Arg Asn
 260 265 270
 Leu Leu Gln Val Asp Leu Thr Lys Arg Phe Gly Asn Leu Lys Asn Gly
 275 280 285
 Val Asn Asp Ile Lys Asn His Lys Trp Phe Ala Thr Thr Asp Trp Ile
 290 295 300
 Ala Ile Tyr Gln Arg Lys Val Glu Ala Pro Phe Ile Pro Lys Phe Lys
 305 310 315 320
 Gly Pro Gly Asp Thr Ser Asn Phe Asp Asp Tyr Glu Glu Glu Glu Ile
 325 330 335
 Arg Val Ser Ile Asn Glu Lys Cys Gly Lys Glu Phe Ser Glu Phe
 340 345 350

<210> 79

<211> 2490

<212> DNA

<213> Homo sapiens

ES 2 613 808 T3

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(1057)

<400> 79

ggtgccctga gaacaggact gagtg	atg gct tcc aac tcc agc gat gtg aaa	52
	Met Ala Ser Asn Ser Ser Asp Val Lys	
	1 5	
gaa ttc tta gcc aaa gcc aaa gaa gat ttt ctt aaa aaa tgg gaa agt		100
Glu Phe Leu Ala Lys Ala Lys Glu Asp Phe Leu Lys Lys Trp Glu Ser		
10 15 20 25		
ccc gct cag aac aca gcc cac ttg gat cag ttt gaa cga atc aag acc		148
Pro Ala Gln Asn Thr Ala His Leu Asp Gln Phe Glu Arg Ile Lys Thr		
30 35 40		
ctc ggc acg ggc tcc ttc ggg cgg gtg atg ctg gtg aaa cac aag gag		196
Leu Gly Thr Gly Ser Phe Gly Arg Val Met Leu Val Lys His Lys Glu		
45 50 55		
acc ggg aac cac tat gcc atg aag atc ctc gac aaa cag aag gtg gtg		244
Thr Gly Asn His Tyr Ala Met Lys Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val Val		
60 65 70		
aaa ctg aaa cag atc gaa cac acc ctg aat gaa aag cgc atc ctg caa		292
Lys Leu Lys Gln Ile Glu His Thr Leu Asn Glu Lys Arg Ile Leu Gln		
75 80 85		
gct gtc aac ttt ccg ttc ctc gtc aaa ctc gag ttc tcc ttc aag gac		340
Ala Val Asn Phe Pro Phe Leu Val Lys Leu Glu Phe Ser Phe Lys Asp		
90 95 100 105		
aac tca aac tta tac atg gtc atg gag tac gtg ccc ggc ggg gag atg		388
Asn Ser Asn Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Val Pro Gly Gly Glu Met		
110 115 120		
ttc tca cac cta ccg ccg atc gga agg ttc agt gag ccc cat gcc cgt		436
Phe Ser His Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Ser Glu Pro His Ala Arg		
125 130 135		
ttc tac gcg gcc cag atc gtc ctg acc ttt gag tat ctg cac tcg ctg		484
Phe Tyr Ala Ala Gln Ile Val Leu Thr Phe Glu Tyr Leu His Ser Leu		
140 145 150		
gat ctc atc tac agg gac ctg aag ccg gag aat ctg ctc att gac cag		532
Asp Leu Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Asp Gln		
155 160 165		
5 cag ggc tac att cag gtg aca gac ttc ggt ttc gcc aag cgc gtg aag		580

ES 2 613 808 T3

Gln Gly Tyr Ile Gln Val Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys Arg Val Lys 170 175 180 185	
ggc cgc act tgg acc ttg tgc ggc acc cct gag tac ctg gcc cct gag Gly Arg Thr Trp Thr Leu Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu 190 195 200	628
att atc ctg agc aaa ggc tac aac aag gcc gtg gac tgg tgg gcc ctg Ile Ile Leu Ser Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Val Asp Trp Trp Ala Leu 205 210 215	676
ggg gtt ctt atc tat gaa atg gcc gct ggc tac ccg ccc ttc ttc gca Gly Val Leu Ile Tyr Glu Met Ala Ala Gly Tyr Pro Pro Phe Phe Ala 220 225 230	724
gac cag ccc atc cag atc tat gag aag atc gtc tct ggg aag gtg cgc Asp Gln Pro Ile Gln Ile Tyr Glu Lys Ile Val Ser Gly Lys Val Arg 235 240 245	772
ttc cct tcc cac ttc agc tct gac ttg aag gac ctg ctg cgg aac ctc Phe Pro Ser His Phe Ser Ser Asp Leu Lys Asp Leu Leu Arg Asn Leu 250 255 260 265	820
ctg cag gta gat ctc acc aag cgc ttt ggg aac ctc aag aat ggg gtc Leu Gln Val Asp Leu Thr Lys Arg Phe Gly Asn Leu Lys Asn Gly Val 270 275 280	868
aac gat atc aag aac cac aag tgg ttt gcc aca act gac tgg att gcc Asn Asp Ile Lys Asn His Lys Trp Phe Ala Thr Thr Asp Trp Ile Ala 285 290 295	916
atc tac cag agg aag gtg gaa gct ccc ttc ata cca aag ttt aaa ggc Ile Tyr Gln Arg Lys Val Glu Ala Pro Phe Ile Pro Lys Phe Lys Gly 300 305 310	964
cct ggg gat acg agt aac ttt gac gac tat gag gaa gaa gaa atc cgg Pro Gly Asp Thr Ser Asn Phe Asp Asp Tyr Glu Glu Glu Glu Ile Arg 315 320 325	1012
gtc tcc atc aat gag aag tgt ggc aag gag ttt tct gag ttt tag Val Ser Ile Asn Glu Lys Cys Gly Lys Glu Phe Ser Glu Phe 330 335 340	1057
gggcatgcct gtgcccccat ggggttttctt ttttcttttt tctttttttt ggtcgggggg	1117
gtgggagggt tggattgaac agccagaggg cccagagtt ccttgcatct aatttcaccc	1177
ccacccccacc ctccagggtt agggggagca ggaagcccag ataatcagag ggacagaaac	1237
accagctgct cccctcctc ccttcaccc tctgcccc tctccactt ttccttcct	1297
ctttccccac agccccccag cccctcagcc ctcccagccc acttctgcct gttttaaacg	1357
agttttctcaa ctccagtcag accagggtctt gctggtgtat ccagggacag ggtatggaaa	1417
gaggggctca cgcttaactc cagccccac ccacaccccc atccccacca accacaggcc	1477
ccacttgcta agggcaaatg aacgaagcgc caaccttcct ttcggagtaa tctgcctgg	1537
gaaggagaga tttttagtga catgttcagt ggggtgcttg ctagaatttt tttaaaaaa	1597
caacaattta aaatcttatt taagtccac cagtgcctcc ctccctcctt cctctactcc	1657
cacccctccc atgtcccccc attcctcaaa tccattttta agagaagcag actgactttg	1717

ES 2 613 808 T3

```

gaaagggagg cgctgggggtt tgaacctccc cgctgctaata cccccctggg cccctccccg 1777
gggaatcctc tctgccaatc ctgcgagggt ctaggcccct ttaggaagcc tccgctctct 1837
ttttcccaa cagacctgtc ttcacccttg ggctttgaaa gccagacaaa gcagctgccc 1897
ctctccctgc caaagaggag tcatccccc aaaaagacaga gggggagccc caagcccaag 1957
tctttcctcc cagcagcgtt tcccccaac tccttaattt tattctccgc tagatttta 2017
cgtccagcct tccctcagct gagtggggag ggcacccctg caaaagggaa cagaagaggc 2077
caagtcccc caagccacgg cccgggggtt aaggctagag ctgctgggga ggggctgcct 2137
gttttactca cccaccagct tccgcctccc ccatcctggg cggccctcct ccagcttagc 2197
tgtcagctgt ccatcacctc tccccactt tctcatttgt gcttttttct ctcgtaata 2257
aaaagtggg agccgctggg gagccacccc attcatcccc gtatttcccc ctctcataac 2317
ttctcccat cccaggagga gttctcaggc ctgggggtgg gcccgggtg ggtgcggggg 2377
cgattcaacc tgtgtgctgc gaaggacgag acttcctctt gaacagtgtg ctgttgtaaa 2437
catatttgaa aactattacc aataaagttt tgtttaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 2490

```

<210> 80

<211> 343

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 80

Met Ala Ser Asn Ser Ser Asp Val Lys Glu Phe Leu Ala Lys Ala Lys
1 5 10 15

Glu Asp Phe Leu Lys Lys Trp Glu Ser Pro Ala Gln Asn Thr Ala His
20 25 30

Leu Asp Gln Phe Glu Arg Ile Lys Thr Leu Gly Thr Gly Ser Phe Gly
35 40 45

Arg Val Met Leu Val Lys His Lys Glu Thr Gly Asn His Tyr Ala Met
50 55 60

Lys Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val Val Lys Leu Lys Gln Ile Glu His
65 70 75 80

Thr Leu Asn Glu Lys Arg Ile Leu Gln Ala Val Asn Phe Pro Phe Leu
85 90 95

Val Lys Leu Glu Phe Ser Phe Lys Asp Asn Ser Asn Leu Tyr Met Val
100 105 110

Met Glu Tyr Val Pro Gly Gly Glu Met Phe Ser His Leu Arg Arg Ile
115 120 125

ES 2 613 808 T3

Gly Arg Phe Ser Glu Pro His Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Gln Ile Val
130 135 140

Leu Thr Phe Glu Tyr Leu His Ser Leu Asp Leu Ile Tyr Arg Asp Leu
145 150 155 160

Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Asp Gln Gln Gly Tyr Ile Gln Val Thr
165 170 175

Asp Phe Gly Phe Ala Lys Arg Val Lys Gly Arg Thr Trp Thr Leu Cys
180 185 190

Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Ile Ile Leu Ser Lys Gly Tyr
195 200 205

Asn Lys Ala Val Asp Trp Trp Ala Leu Gly Val Leu Ile Tyr Glu Met
210 215 220

Ala Ala Gly Tyr Pro Pro Phe Phe Ala Asp Gln Pro Ile Gln Ile Tyr
225 230 235 240

Glu Lys Ile Val Ser Gly Lys Val Arg Phe Pro Ser His Phe Ser Ser
245 250 255

Asp Leu Lys Asp Leu Leu Arg Asn Leu Leu Gln Val Asp Leu Thr Lys
260 265 270

Arg Phe Gly Asn Leu Lys Asn Gly Val Asn Asp Ile Lys Asn His Lys
275 280 285

Trp Phe Ala Thr Thr Asp Trp Ile Ala Ile Tyr Gln Arg Lys Val Glu
290 295 300

Ala Pro Phe Ile Pro Lys Phe Lys Gly Pro Gly Asp Thr Ser Asn Phe
305 310 315 320

Asp Asp Tyr Glu Glu Glu Glu Ile Arg Val Ser Ile Asn Glu Lys Cys
325 330 335

Gly Lys Glu Phe Ser Glu Phe
340

<210> 81
<211> 2794
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (341)..(1783)

ES 2 613 808 T3

```

<400> 81
cggcaggacc gagcgcgcca ggcggctggc ccagcgccagc cagcgcgccc cgaaggacgg      60

gagcaggcgg ccgagcaccg agcgctgggc accgggcacc gagcggcggc ggcacgcgag      120

gcccggcccc gagcagcgcc cccgcccgcc gcggcctcca gcccggcccc gccacgcgcc      180

ggcccgcggg gatgcggagc ggcgggcgcc ggaggccgcg gcccggctag gcccgcgctc      240

gcgcccggac gcggcgggcc gaggtgtgtg ccaggccagc tgggctcggg gagcgccagc      300

ctgagaggag cgcgtagcgc tcgcgggagc ctcgggcacc atg agc gac gtg gct      355
                Met Ser Asp Val Ala
                1          5

att gtg aag gag ggt tgg ctg cac aaa cga ggg gag tac atc aag acc      403
Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly Glu Tyr Ile Lys Thr
                10          15          20

tgg cgg cca cgc tac ttc ctc ctc aag aat gat ggc acc ttc att ggc      451
Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp Gly Thr Phe Ile Gly
                25          30          35

tac aag gag cgg ccg cag gat gtg gac caa cgt gag gct ccc ctc aac      499
Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg Glu Ala Pro Leu Asn
                40          45          50

aac ttc tct gtg gcg cag tgc cag ctg atg aag acg gag cgg ccc cgg      547
Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys Thr Glu Arg Pro Arg
                55          60          65

ccc aac acc ttc atc atc cgc tgc ctg cag tgg acc act gtc atc gaa      595
Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr Thr Val Ile Glu
                70          75          80          85

cgc acc ttc cat gtg gag act cct gag gag cgg gag gag tgg aca acc      643
Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Trp Thr Thr
                90          95          100

gcc atc cag act gtg gct gac ggc ctc aag aag cag gag gag gag gag      691
Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys Gln Glu Glu Glu Glu
                105          110          115

atg gac ttc cgg tcg ggc tca ccc agt gac aac tca ggg gct gaa gag      739
Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn Ser Gly Ala Glu Glu
                120          125          130

atg gag gtg tcc ctg gcc aag ccc aag cac cgc gtg acc atg aac gag      787
Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg Val Thr Met Asn Glu
                135          140          145

ttt gag tac ctg aag ctg ctg ggc aag ggc act ttc ggc aag gtg atc      835
Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile
                150          155          160          165

ctg gtg aag gag aag gcc aca ggc cgc tac tac gcc atg aag atc ctc      883
Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu
                170          175          180

aag aag gaa gtc atc gtg gcc aag gac gag gtg gcc cac aca ctc acc      931
Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val Ala His Thr Leu Thr
                185          190          195

```

ES 2 613 808 T3

gag aac cgc gtc ctg cag aac tcc agg cac ccc ttc ctc aca gcc ctg Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro Phe Leu Thr Ala Leu 200 205 210	979
aag tac tct ttc cag acc cac gac cgc ctc tgc ttt gtc atg gag tac Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr 215 220 225	1027
gcc aac ggg ggc gag ctg ttc ttc cac ctg tcc cgg gag cgt gtg ttc Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe 230 235 240 245	1075
tcc gag gac cgg gcc cgc ttc tat ggc gct gag att gtg tca gcc ctg Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu 250 255 260	1123
gac tac ctg cac tcg gag aag aac gtg gtg tac cgg gac ctc aag ctg Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Tyr Arg Asp Leu Lys Leu 265 270 275	1171
gag aac ctc atg ctg gac aag gac ggg cac att aag atc aca gac ttc Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr Asp Phe 280 285 290	1219
ggg ctg tgc aag gag ggg atc aag gac ggt gcc acc atg aag acc ttt Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe 295 300 305	1267
tgc ggc aca cct gag tac ctg gcc ccc gag gtg ctg gag gac aat gac Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp Asn Asp 310 315 320 325	1315
tac ggc cgt gca gtg gac tgg tgg ggg ctg ggc gtg gtc atg tac gag Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met Tyr Glu 330 335 340	1363
atg atg tgc ggt cgc ctg ccc ttc tac aac cag gac cat gag aag ctt Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu Lys Leu 345 350 355	1411
ttt gag ctc atc ctc atg gag gag atc cgc ttc ccg cgc acg ctt ggt Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe Pro Arg Thr Leu Gly 360 365 370	1459
ccc gag gcc aag tcc ttg ctt tca ggg ctg ctc aag aag gac ccc aag Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Lys Asp Pro Lys 375 380 385	1507
cag agg ctt ggc ggg gcc tcc gag gac gcc aag gag atc atg cag cat Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys Glu Ile Met Gln His 390 395 400 405	1555
cgc ttc ttt gcc ggt atc gtg tgg cag cac gtg tac gag aag aag ctc Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val Tyr Glu Lys Lys Leu 410 415 420	1603
agc cca ccc ttc aag ccc cag gtc acg tcg gag act gac acc agg tat Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr Arg Tyr 425 430 435	1651
ttt gat gag gag ttc acg gcc cag atg atc acc atc aca cca cct gac Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr Ile Thr Pro Pro Asp 440 445 450	1699
caa gat gac agc atg gag tgt gtg gac agc gag cgc agg ccc cac ttc	1747

ES 2 613 808 T3

Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu Arg Arg Pro His Phe
 455 460 465

ccc cag ttc tcc tac tcg gcc agc ggc acg gcc tga ggcggcgggtg 1793
 Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
 470 475 480

gactgcgctg gacgatagct tggagggatg gagaggcggc ctcgtgccat gatctgtatt 1853
 taatgggtttt tattttctcg gtgcatttga gagaagccac gctgtcctct cgagcccaga 1913
 tggaagacg tttttgtgct gtgggcagca ccctcccccg cagcggggta gggaagaaaa 1973
 ctatcctgcg ggttttaatt tatttcattcc agtttgttct cggggtgtgg cctcagccct 2033
 cagaacaatc cgattcacgt agggaaatgt taaggacttc tgcagctatg cgcaatgtgg 2093
 cattgggggg ccgggcaggt cctgcccatg tgtccctca ctctgtcagc cagccgccct 2153
 gggctgtctg tcaccagcta tctgtcatct ctctggggcc ctgggcctca gttcaacctg 2213
 gtggcaccag atgcaacctc actatggtat gctggccagc accctctcct gggggtggca 2273
 ggcacacagc agccccccag cactaaggcc gtgtctctga ggacgtcatc ggaggctggg 2333
 cccctgggat gggaccaggg atgggggatg ggcagggtt taccagtgg gacagaggag 2393
 caaggtttaa atttgttatt gtgtattatg ttgttcaaat gcattttggg ggtttttaat 2453
 ctttgtgaca ggaagccct ccccttccc cttctgtgtc acagttcttg gtgactgtcc 2513
 caccgggagc ctccccctca gatgatctct ccacggtagc acttgacctt ttcgacgctt 2573
 aacctttccg ctgtcgcccc aggccctccc tgactccctg tgggggtggc catccctggg 2633
 cccctccacg cctcctggcc agacgctgcc gctgccgctg caccacggcg tttttttaca 2693
 acattcaact ttagtatttt tactattata atataatatg gaaccttccc tccaaattct 2753
 tcaataaaag ttgcttttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2794

<210> 82
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 82
 Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp
 20 25 30

Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg
 35 40 45

Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys
 50 55 60

ES 2 613 808 T3

Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
 65 70 75 80
 Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg
 85 90 95
 Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys
 100 105 110
 Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn
 115 120 125
 Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg
 130 135 140
 Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr
 145 150 155 160
 Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr
 165 170 175
 Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val
 180 185 190
 Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro
 195 200 205
 Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys
 210 215 220
 Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser
 225 230 235 240
 Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu
 245 250 255
 Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr
 260 265 270
 Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile
 275 280 285
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala
 290 295 300
 Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320
 Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly

ES 2 613 808 T3

325

330

335

Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln
340 345 350

Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe
355 360 365

Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu
370 375 380

Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys
385 390 395 400

Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val
405 410 415

Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu
420 425 430

Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr
435 440 445

Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu
450 455 460

Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
465 470 475 480

<210> 83

<211> 2878

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (425)..(1867)

<400> 83

cggcaggacc gagcgcggca ggcggctggc ccagcgcagc cagcgcggcc cgaaggacgg 60

gagcaggcgg ccgagcaccg agcgtctggc accgggcacc gagcggcggc ggcacgcgag 120

gcccggcccc gagcagcgcc cccgcccgcc gcggcctcca gcccggcccc gccacgcgcc 180

ggcccgcggg gatgcgagc ggcgggcgcc ggaggccgag gcccggctag gcccgcgctc 240

gcgcccggac gcggcgggcc ggggcttagg gaaggccgag ccagcctggg tcaaagaagt 300

caaaggggct gcctggagga ggcagcctgt cagctggtgc atcagaggct gtggccaggc 360

cagctgggct cggggagcgc cagcctgaga ggagcgcgtg agcgtcgcgg gagcctcggg 420

10 cacc atg agc gac gtg gct att gtg aag gag ggt tgg ctg cac aaa cga 469

ES 2 613 808 T3

	Met 1	Ser	Asp	Val	Ala 5	Ile	Val	Lys	Glu	Gly 10	Trp	Leu	His	Lys	Arg 15	
ggg Gly	gag Glu	tac Tyr	atc Ile	aag Lys 20	acc Thr	tgg Trp	cgg Arg	cca Pro	cgc Arg 25	tac Tyr	ttc Phe	ctc Leu	ctc Leu	aag Lys 30	aat Asn	517
gat Asp	ggc Gly	acc Thr	ttc Phe 35	att Ile	ggc Gly	tac Tyr	aag Lys 40	gag Glu	cgg Arg	ccg Pro	cag Gln	gat Asp	gtg Val 45	gac Asp	caa Gln	565
cgt Arg	gag Glu	gct Ala 50	ccc Pro	ctc Leu	aac Asn	aac Asn	ttc Phe 55	tct Ser	gtg Val	gcg Ala	cag Gln	tgc Cys 60	cag Gln	ctg Leu	atg Met	613
aag Lys	acg Thr 65	gag Glu	cgg Arg	ccc Pro	cgg Arg	ccc Pro 70	aac Asn	acc Thr	ttc Phe	atc Ile 75	atc Ile	cgc Arg	tgc Cys	ctg Leu	cag Gln	661
tgg Trp 80	acc Thr	act Thr	gtc Val	atc Ile 85	gaa Glu	cgc Arg	acc Thr	ttc Phe	cat His 90	gtg Val 90	gag Glu	act Thr	cct Pro	gag Glu 95	gag Glu	709
cgg Arg	gag Glu	gag Glu	tgg Trp 100	aca Thr	acc Ala	gcc Ile	atc Gln	cag Thr 105	act Thr	gtg Val	gct Ala	gac Asp	ggc Gly 110	ctc Leu	aag Lys	757
aag Lys	cag Gln	gag Glu 115	gag Glu	gag Glu	gag Glu	atg Met	gac Asp 120	ttc Phe 120	cgg Arg	tcg Ser	ggc Gly	tca Ser	ccc Pro 125	agt Ser	gac Asp	805
aac Asn	tca Ser 130	ggg Gly	gct Ala	gaa Glu	gag Glu	atg Met	gag Glu 135	gtg Val	tcc Ser	ctg Leu	gcc Ala	aag Lys 140	ccc Pro	aag Lys	cac His	853
cgc Arg	gtg Val 145	acc Thr	atg Met	aac Asn	gag Glu 150	ttt Phe 150	gag Glu	tac Tyr	ctg Leu	aag Lys 155	ctg Leu	ctg Leu	ggc Gly	aag Lys	ggc Gly	901
act Thr 160	ttc Phe	ggc Gly	aag Lys	gtg Val 165	atc Ile 165	ctg Leu	gtg Val	aag Lys	gag Glu	aag Lys 170	gcc Ala	aca Thr	ggc Gly	cgc Arg	tac Tyr 175	949
tac Tyr	gcc Ala	atg Met	aag Lys 180	atc Ile 180	ctc Leu	aag Lys	aag Lys	gaa Glu	gtc Val 185	atc Ile	gtg Val	gcc Ala	aag Lys 190	gac Asp	gag Glu	997
gtg Val	gcc Ala	cac His 195	aca Thr 195	ctc Leu	acc Thr	gag Glu	aac Asn	cgc Arg 200	gtc Val	ctg Leu	cag Gln	aac Asn	tcc Ser 205	agg Arg	cac His	1045
ccc Pro	ttc Phe 210	ctc Leu	aca Thr	gcc Ala	ctg Leu	aag Lys	tac Tyr 215	tct Ser	ttc Phe	cag Gln	acc Thr	cac His 220	gac Asp	cgc Arg	ctc Leu	1093
tgc Cys	ttt Phe 225	gtc Val	atg Met	gag Glu	tac Tyr 230	gcc Ala	aac Asn	ggg Gly	ggc Gly	gag Glu	ctg Leu 235	ttc Phe	ttc Phe	cac His	ctg Leu	1141
tcc Ser 240	cgg Arg	gag Glu	cgt Arg	gtg Val 245	ttc Phe 245	tcc Ser	gag Glu	gac Asp	cgg Arg	gcc Ala 250	cgc Arg	ttc Phe	tat Tyr	ggc Gly	gct Ala 255	1189
gag Glu	att Ile	gtg Val	tca Ser	gcc Ala	ctg Leu	gac Asp	tac Tyr	ctg Leu	cac His	tcg Ser	gag Glu	aag Lys	aac Asn	gtg Val	gtg Val	1237

ES 2 613 808 T3

260	265	270	
tac cgg gac ctc aag ctg gag aac ctc atg ctg gac aag gac ggg cac Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His 275 280 285			1285
att aag atc aca gac ttc ggg ctg tgc aag gag ggg atc aag gac ggt Ile Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly 290 295 300			1333
gcc acc atg aag acc ttt tgc ggc aca cct gag tac ctg gcc ccc gag Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu 305 310 315			1381
gtg ctg gag gac aat gac tac ggc cgt gca gtg gac tgg tgg ggg ctg Val Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu 320 325 330 335			1429
ggc gtg gtc atg tac gag atg atg tgc ggt cgc ctg ccc ttc tac aac Gly Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn 340 345 350			1477
cag gac cat gag aag ctt ttt gag ctc atc ctc atg gag gag atc cgc Gln Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg 355 360 365			1525
ttc ccg cgc acg ctt ggt ccc gag gcc aag tcc ttg ctt tca ggg ctg Phe Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu 370 375 380			1573
ctc aag aag gac ccc aag cag agg ctt ggc ggg ggc tcc gag gac gcc Leu Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala 385 390 395			1621
aag gag atc atg cag cat cgc ttc ttt gcc ggt atc gtg tgg cag cac Lys Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His 400 405 410 415			1669
gtg tac gag aag aag ctc agc cca ccc ttc aag ccc cag gtc acg tcg Val Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser 420 425 430			1717
gag act gac acc agg tat ttt gat gag gag ttc acg gcc cag atg atc Glu Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile 435 440 445			1765
acc atc aca cca cct gac caa gat gac agc atg gag tgt gtg gac agc Thr Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser 450 455 460			1813
gag cgc agg ccc cac ttc ccc cag ttc tcc tac tcg gcc agc ggc acg Glu Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr 465 470 475			1861
gcc tga ggcggcggtg gactgcgctg gacgatatgct tggagggatg gagaggcggc Ala 480			1917
ctcgtgccat gatctgtatt taatgggtttt tttttctcgg gtgcatttga gagaagccac			1977
gctgtcctct cgagcccaga tggaaagacg tttttgtgct gtgggcagca ccctcccccg			2037
cagcggggta gggaagaaaa ctatcctgcg ggttttaatt tatttcatcc agtttgttct			2097
ccgggtgtgg cctcagccct cagaacaatc cgattcacgt agggaaatgt taaggacttc			2157

ES 2 613 808 T3

tgcagctatg cgcaatgtgg cattgggggg ccgggcaggt cctgcccattg tgtccctca 2217
ctctgtcagc cagccgccct gggctgtctg tcaccagcta tctgtcatct ctctggggcc 2277
ctgggcctca gttcaacctg gtggcaccag atgcaacctc actatggat gctggccagc 2337
accctctcct gggggtggca ggcacacagc agccccccag cactaaggcc gtgtctctga 2397
ggacgtcatc ggaggctggg cccctgggat gggaccaggg atgggggatg ggccagggtt 2457
taccagtggt gacagaggag caaggtttta atttgttatt gtgtattatg ttgttcaaata 2517
gcattttggg ggtttttaat ctttgtgaca ggaagccct ccccttccc cttctgtgtc 2577
acagtctctg gtgactgtcc caccgggagc ctccccctca gatgatctct ccacggtagc 2637
acttgacctt ttcgacgctt aacctttccg ctgtcgcccc aggccctccc tgactccctg 2697
tgggggtggc catccctggg cccctccacg cctcctggcc agacgtgcc gctgccgctg 2757
caccacggcg tttttttaca acattcaact ttagtatttt tactattata atataatatg 2817
gaaccttccc tccaaattct tcaataaaag ttgcttttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2877
a 2878

<210> 84

<211> 480

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 84

Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
1 5 10 15

Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp
20 25 30

Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg
35 40 45

Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys
50 55 60

Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
65 70 75 80

Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg
85 90 95

Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys
100 105 110

Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn
115 120 125

ES 2 613 808 T3

Ser	Gly	Ala	Glu	Glu	Met	Glu	Val	Ser	Leu	Ala	Lys	Pro	Lys	His	Arg		
130						135					140						
Val	Thr	Met	Asn	Glu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Lys	Leu	Leu	Gly	Lys	Gly	Thr		
145				150						155					160		
Phe	Gly	Lys	Val	Ile	Leu	Val	Lys	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Arg	Tyr	Tyr		
			165					170						175			
Ala	Met	Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Val	Ile	Val	Ala	Lys	Asp	Glu	Val		
			180					185					190				
Ala	His	Thr	Leu	Thr	Glu	Asn	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro		
		195					200					205					
Phe	Leu	Thr	Ala	Leu	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gln	Thr	His	Asp	Arg	Leu	Cys		
210						215					220						
Phe	Val	Met	Glu	Tyr	Ala	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	His	Leu	Ser		
225					230					235					240		
Arg	Glu	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Asp	Arg	Ala	Arg	Phe	Tyr	Gly	Ala	Glu		
			245						250					255			
Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Asp	Tyr	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Asn	Val	Val	Tyr		
		260						265					270				
Arg	Asp	Leu	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	His	Ile		
		275					280					285					
Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly	Ile	Lys	Asp	Gly	Ala		
290						295					300						
Thr	Met	Lys	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Val		
305					310					315					320		
Leu	Glu	Asp	Asn	Asp	Tyr	Gly	Arg	Ala	Val	Asp	Trp	Trp	Gly	Leu	Gly		
			325						330					335			
Val	Val	Met	Tyr	Glu	Met	Met	Cys	Gly	Arg	Leu	Pro	Phe	Tyr	Asn	Gln		
		340						345					350				
Asp	His	Glu	Lys	Leu	Phe	Glu	Leu	Ile	Leu	Met	Glu	Glu	Ile	Arg	Phe		
		355					360					365					
Pro	Arg	Thr	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu		
370						375					380						

ES 2 613 808 T3

Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys
385 390 395 400

Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val
405 410 415

Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu
420 425 430

Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr
435 440 445

Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu
450 455 460

Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
465 470 475 480

<210> 85

<211> 3008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (555)..(1997)

<400> 85

taattatggg tctgtaacca ccctggactg ggtgctcctc actgacggac ttgtctgaac 60

ctctctttgt ctccagcgcc cagcactggg cctggcaaaa cctgagacgc ccggtacatg 120

ttggccaaat gaatgaacca gattcagacc ggcaggggcg ctgtggttta ggaggggcct 180

ggggtttctc ccaggaggtt tttgggcttg cgctggaggg ctctggactc ccgtttgcgc 240

cagtggcctg catcctggtc ctgtcttctt catgtttgaa tttctttgct ttcctagtct 300

ggggagcagg gaggagccct gtgccctgtc ccaggatcca tgggtaggaa caccatggac 360

agggagagca aacggggcca tctgtcacca ggggcttagg gaaggccgag ccagcctggg 420

tcaaagaagt caaaggggct gcctggagga ggcagcctgt cagctggtgc atcagaggct 480

gtggccaggc cagctgggct cggggagcgc cagcctgaga ggagcgcgtg agcgtcgcgg 540

gagcctcggg cacc atg agc gac gtg gct att gtg aag gag ggt tgg ctg 590

Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu
1 5 10

cac aaa cga ggg gag tac atc aag acc tgg cgg cca cgc tac ttc ctc 638

His Lys Arg Gly Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu
15 20 25

ctc aag aat gat ggc acc ttc att ggc tac aag gag cgg ccg cag gat 686

Leu Lys Asn Asp Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp
30 35 40

5

10

ES 2 613 808 T3

gtg gac caa cgt gag gct ccc ctc aac aac ttc tct gtg gcg cag tgc Val Asp Gln Arg Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys 45 50 55 60	734
cag ctg atg aag acg gag cgg ccc cgg ccc aac acc ttc atc atc cgc Gln Leu Met Lys Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg 65 70 75	782
tgc ctg cag tgg acc act gtc atc gaa cgc acc ttc cat gtg gag act Cys Leu Gln Trp Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr 80 85 90	830
cct gag gag cgg gag gag tgg aca acc gcc atc cag act gtg gct gac Pro Glu Glu Arg Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp 95 100 105	878
ggc ctc aag aag cag gag gag gag gag atg gac ttc cgg tcg ggc tca Gly Leu Lys Lys Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser 110 115 120	926
ccc agt gac aac tca ggg gct gaa gag atg gag gtg tcc ctg gcc aag Pro Ser Asp Asn Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys 125 130 135 140	974
ccc aag cac cgc gtg acc atg aac gag ttt gag tac ctg aag ctg ctg Pro Lys His Arg Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu 145 150 155	1022
ggc aag ggc act ttc ggc aag gtg atc ctg gtg aag gag aag gcc aca Gly Lys Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr 160 165 170	1070
ggc cgc tac tac gcc atg aag atc ctc aag aag gaa gtc atc gtg gcc Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala 175 180 185	1118
aag gac gag gtg gcc cac aca ctc acc gag aac cgc gtc ctg cag aac Lys Asp Glu Val Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn 190 195 200	1166
tcc agg cac ccc ttc ctc aca gcc ctg aag tac tct ttc cag acc cac Ser Arg His Pro Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His 205 210 215 220	1214
gac cgc ctc tgc ttt gtc atg gag tac gcc aac ggg ggc gag ctg ttc Asp Arg Leu Cys Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe 225 230 235	1262
ttc cac ctg tcc cgg gag cgt gtg ttc tcc gag gac cgg gcc cgc ttc Phe His Leu Ser Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe 240 245 250	1310
tat ggc gct gag att gtg tca gcc ctg gac tac ctg cac tcg gag aag Tyr Gly Ala Glu Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys 255 260 265	1358
aac gtg gtg tac cgg gac ctc aag ctg gag aac ctc atg ctg gac aag Asn Val Val Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys 270 275 280	1406
gac ggg cac att aag atc aca gac ttc ggg ctg tgc aag gag ggg atc Asp Gly His Ile Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile 285 290 295 300	1454

ES 2 613 808 T3

aag gac ggt gcc acc atg aag acc ttt tgc ggc aca cct gag tac ctg Lys Asp Gly Ala Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu 305 310 315	1502
gcc ccc gag gtg ctg gag gac aat gac tac ggc cgt gca gtg gac tgg Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp 320 325 330	1550
tgg ggg ctg ggc gtg gtc atg tac gag atg atg tgc ggt cgc ctg ccc Trp Gly Leu Gly Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro 335 340 345	1598
ttc tac aac cag gac cat gag aag ctt ttt gag ctc atc ctc atg gag Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu 350 355 360	1646
gag atc cgc ttc ccg cgc acg ctt ggt ccc gag gcc aag tcc ttg ctt Glu Ile Arg Phe Pro Arg Thr Leu Gly Pro Gln Ala Lys Ser Leu Leu 365 370 375 380	1694
tca ggg ctg ctc aag gag gac ccc aag cag agg ctt ggc ggg ggc tcc Ser Gly Leu Leu Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser 385 390 395	1742
gag gac gcc aag gag atc atg cag cat cgc ttc ttt gcc ggt atc gtg Glu Asp Ala Lys Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val 400 405 410	1790
tgg cag cac gtg tac gag aag aag ctc agc cca ccc ttc aag ccc cag Trp Gln His Val Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln 415 420 425	1838
gtc acg tcg gag act gac acc agg tat ttt gat gag gag ttc acg gcc Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala 430 435 440	1886
cag atg atc acc atc aca cca cct gac caa gat gac agc atg gag tgt Gln Met Ile Thr Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys 445 450 455 460	1934
gtg gac agc gag cgc agg ccc cac ttc ccc cag ttc tcc tac tcg gcc Val Asp Ser Glu Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala 465 470 475	1982
agc ggc acg gcc tga ggcggcgggtg gactgcgctg gacgatagct tggaggggatg Ser Gly Thr Ala 480	2037
gagagggcggc ctctgtccat gatctgtatt taatggtttt tatttctcgg gtgcatttga	2097
gagaagccac gctgtcctct cgagcccaga tggaaagaog tttttgtgct gtgggcagca	2157
ccctcccccag cagcggggta ggaagaaaa ctatcctgcg ggttttaatt tatttcatcc	2217
agtttgttct ccgggtgtgg cctcagccct cagaacaatc cgattcacgt agggaaatgt	2277
taaggacttc tgcagctatg cgcaatgtgg cattgggggg ccgggcaggt cctgcccattg	2337
tgtccctca ctctgtcagc cagccgccct gggctgtctg tcaccagcta tctgtcatct	2397
ctctggggcc ctgggcctca gtccaacctg gtggcaccag atgcaacctc actatggtat	2457
gctggccagc accctctcct gggggtggca ggcacacagc agccccccag cactaaggcc	2517
gtgtctctga ggacgtcatc ggaggctggg cccctgggat gggaccaggg atgggggatg	2577

ES 2 613 808 T3

```

ggccagggtt taccagtg gacagaggag caaggtttaa atttgttatt gtgtattatg 2637
ttgttcaa at gcat ttttggg ggtttttaat ctttgtgaca ggaaagccct ccccttccc 2697
cttctgtgtc acagttcttg gtgactgtcc caccgggagc ctccccctca gatgatctct 2757
ccacggtagc acttgacctt ttgacgctt aacctttccg ctgtcgcccc aggccctccc 2817
tgactccctg tgggggtggc catccctggg cccctccacg cctcctggcc agacgtgccc 2877
gctgccgctg caccacggcg tttttttaca acattcaact ttagtatttt tactattata 2937
atataatatg gaaccttccc tccaaattct tcaataaaag ttgcttttca aaaaaaaaaa 2997
aaaaaaaaa a 3008

```

<210> 86

<211> 480

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 86

```

Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
1          5          10          15

Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp
20          25          30

Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg
35          40          45

Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys
50          55          60

Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
65          70          75          80

Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg
85          90          95

Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys
100         105         110

Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn
115         120         125

Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg
130         135         140

Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr
145         150         155         160

```

ES 2 613 808 T3

Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr
 165 170 175
 Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val
 180 185 190
 Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro
 195 200 205
 Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys
 210 215 220
 Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser
 225 230 235 240
 Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu
 245 250 255
 Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr
 260 265 270
 Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile
 275 280 285
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala
 290 295 300
 Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320
 Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly
 325 330 335
 Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln
 340 345 350
 Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe
 355 360 365
 Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu
 370 375 380
 Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys
 385 390 395 400
 Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val
 405 410 415
 Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu

ES 2 613 808 T3

					420					425					430				
Thr	Asp	Thr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Glu	Glu	Phe	Thr	Ala	Gln	Met	Ile	Thr				
					435					440					445				
Ile	Thr	Pro	Pro	Asp	Gln	Asp	Asp	Ser	Met	Glu	Cys	Val	Asp	Ser	Glu				
					450					455					460				
Arg	Arg	Pro	His	Phe	Pro	Gln	Phe	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Ala				
					465					470					475				
															480				

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que inhibe la unión de polipéptido ERAP1 al polipéptido PHB2, que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en cualquiera de los siguientes (a) y (b):
 - (a) una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 31; y
 - 5 (b) una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 31 en la que uno, dos, o varios residuos de aminoácidos distintos de glutamina en la posición 1, ácido aspártico en la posición 5, y glutamina en la posición 9, están sustituidos con otros residuos de aminoácidos.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en (a) a (d) descrito a continuación:
 - 10 (a) una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 27;
 - (b) una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 27 en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos distintos de glutamina en la posición 1, ácido aspártico en la posición 5 y glutamina en la posición 9 están sustituidos con otros residuos de aminoácidos;
 - (c) una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 30; y
 - 15 (d) una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 30 en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos distintos de glutamina en la posición 5, ácido aspártico en la posición 9 y glutamina en la posición 13, están sustituidos con otros residuos de aminoácidos además.
3. El péptido de acuerdo con reivindicación 1 ó 2, en el que el aminoácido consiste en 50 o menos residuos de aminoácidos.
- 20 4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido es modificado por una sustancia permeable de la membrana celular.
5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el péptido es modificado por una sustancia permeable de la membrana celular.
6. Un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 7. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polinucleótido que codifica el péptido.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer.
- 30 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el cáncer es positivo para el receptor de estrógeno.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en la que el cáncer es un cáncer de mama.
- 35 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 ó 11, en la que el cáncer es resistente al tamoxifeno.
13. Una composición farmacéutica para:
 - (a) potenciar los efectos terapéuticos de un agente de terapia hormonal en el cáncer; o
 - (b) suprimir la activación del receptor de estrógeno en células positivas para el receptor de estrógeno, en donde la composición farmacéutica comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polinucleótido que codifica el péptido.
- 40

FIG. 1-1

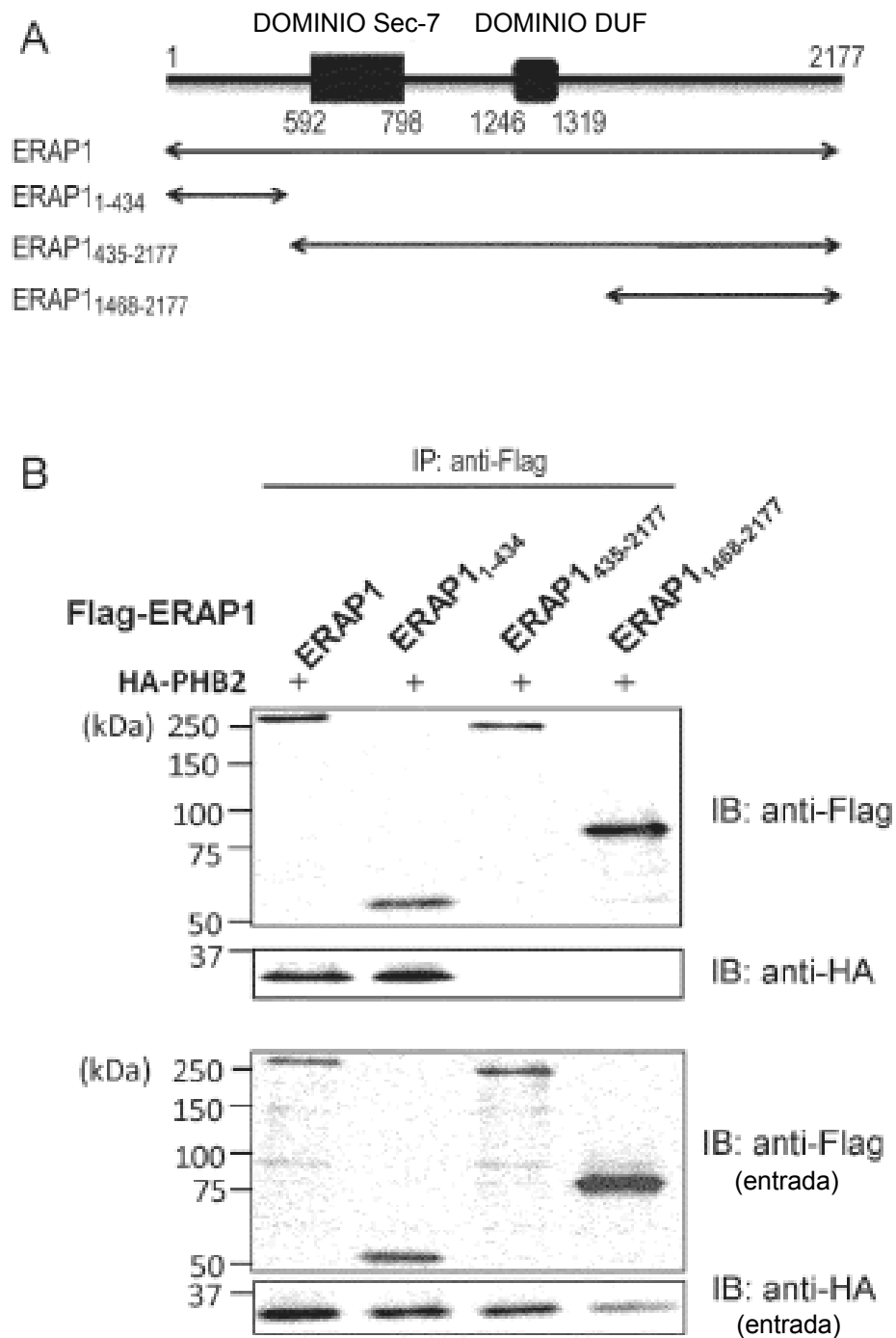


FIG. 1-2

C



D

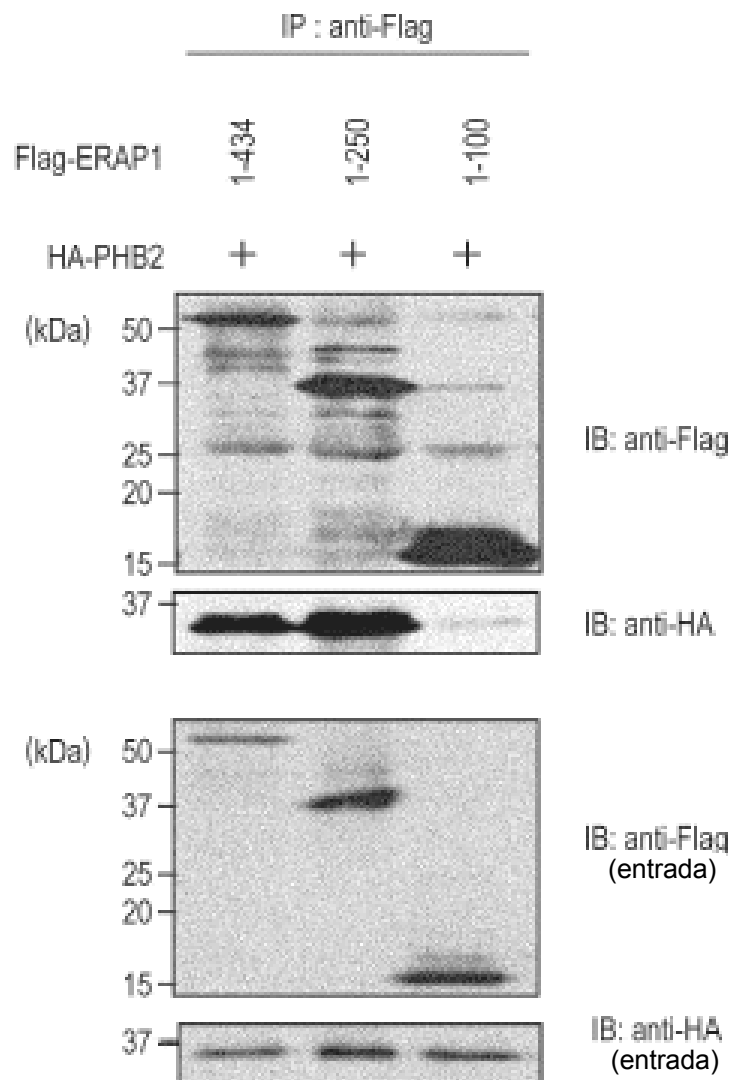
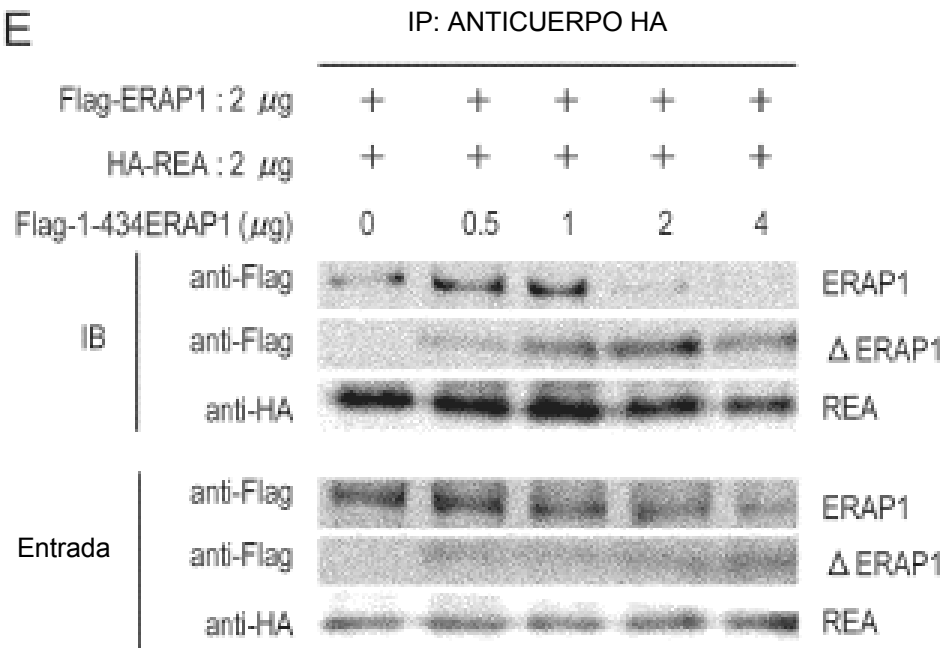


FIG. 1-3

E



F

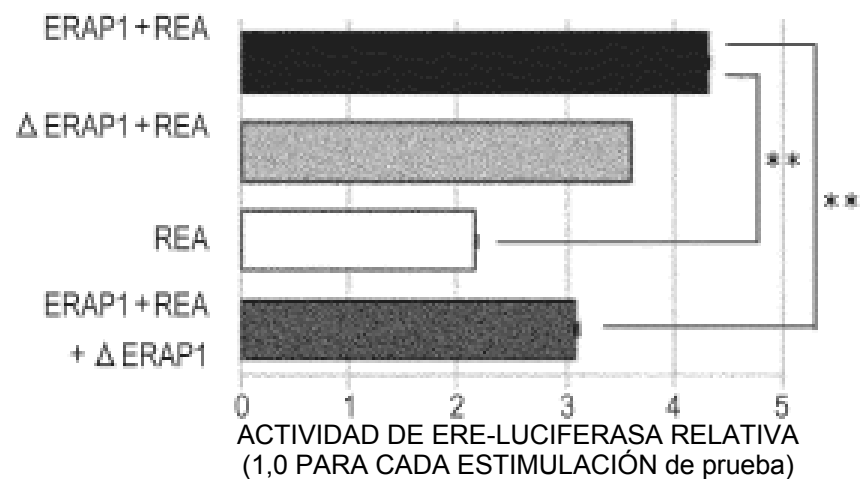
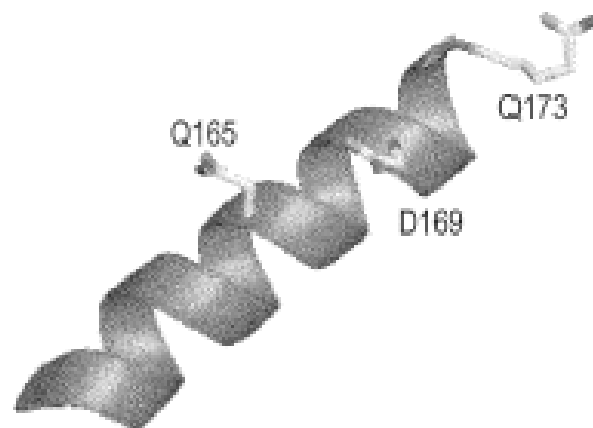


FIG. 1-4

G

	157	165	169	173	
SOFTWARE PSIVER	- - - + + - + + + - + + + - + + - - - - -				
ERAP1 ₁₋₄₃₄	-S-I-N-T-A-V-R-A-T-L-S-Q-M-L-S-D-L-T-L-Q-L-R-Q-R-Q-E-				
mutante ERAP1	-S-I-N-T-A-V-R-A-T-L-S-A-M-L-S-A-L-T-L-A-L-R-Q-R-Q-E-				

H



I

		IP : Flag-Ab		IP : HA-Ab	
		+	+	+	+
HA-PHB2		+	+	+	+
Flag-ERAP1 ₁₋₄₃₄		+	-	+	-
mutante Flag-ERAP1		-	+	-	+

IB	anti-Flag				
	anti-HA				
entrada	anti-Flag				
	anti-HA				

FIG. 1-5

J

péptido ERAP1	11R-GGG-QMLSDLTQLROR (SEQ ID NO : 27)
péptido ERAP1-codificado	11R-GGG-DRQLQLSTLQRM (SEQ ID NO : 28)
péptido ERAP1-mutante	11R-GGG-AMLSALTALROR (SEQ ID NO : 29)

K

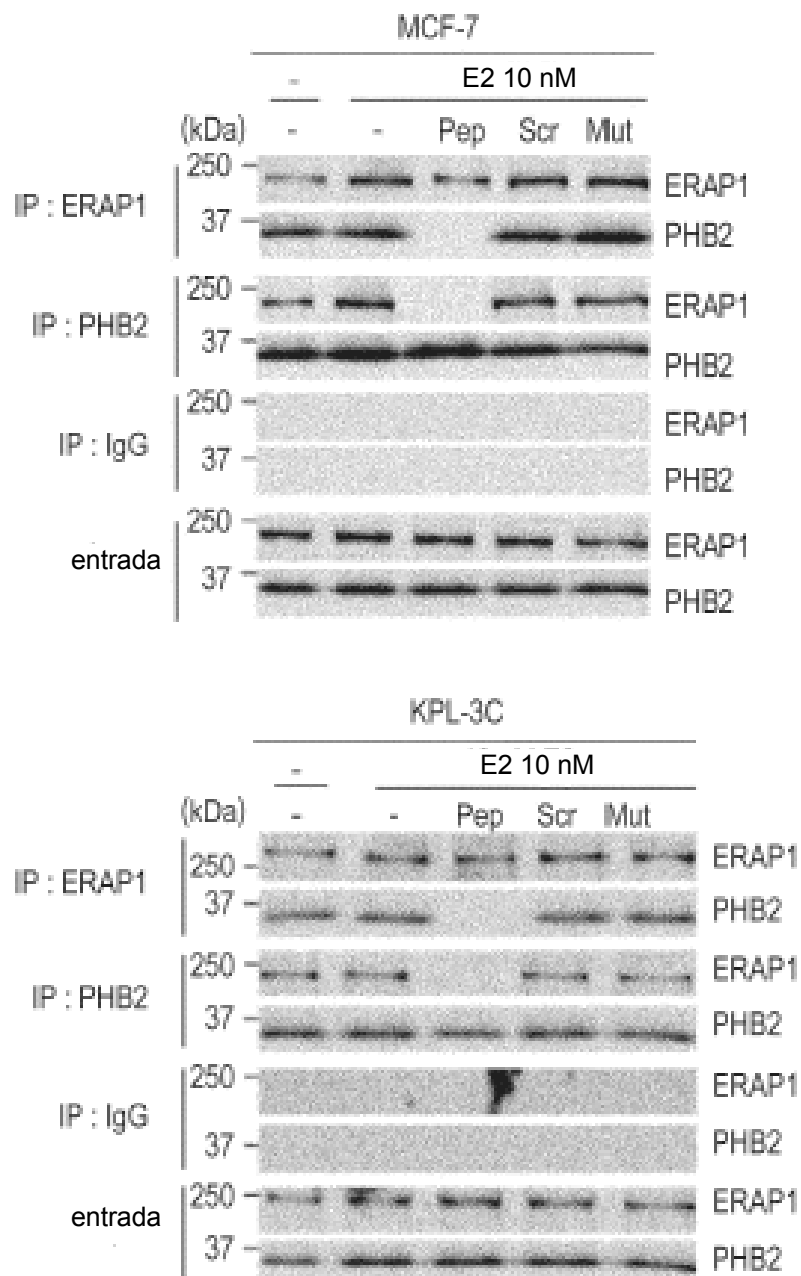


FIG. 2

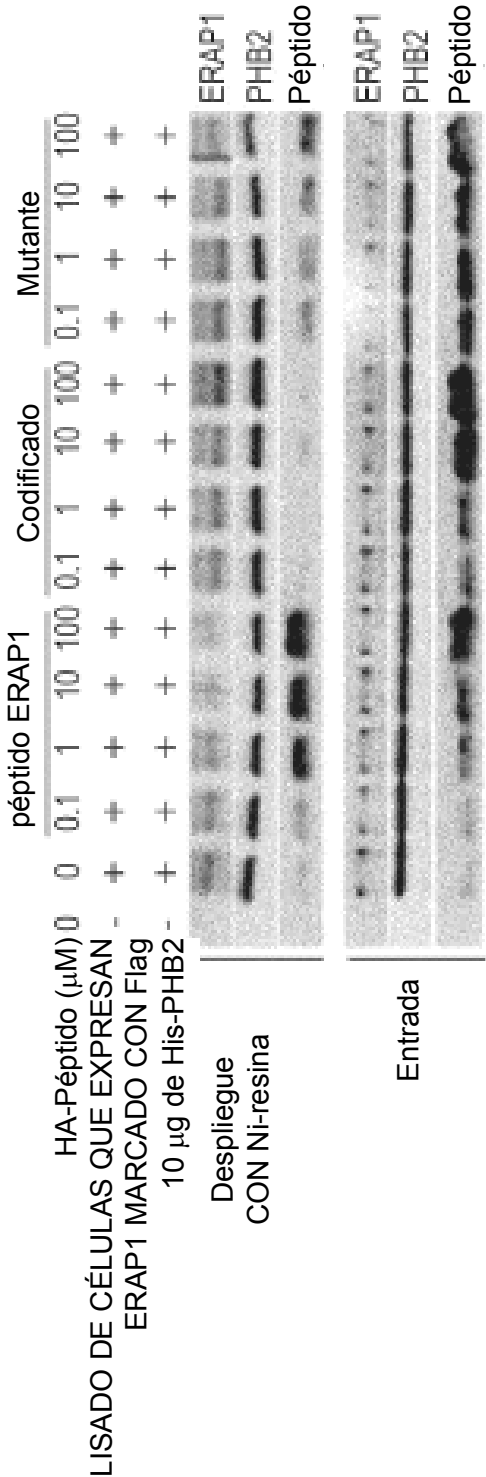


FIG. 3-1

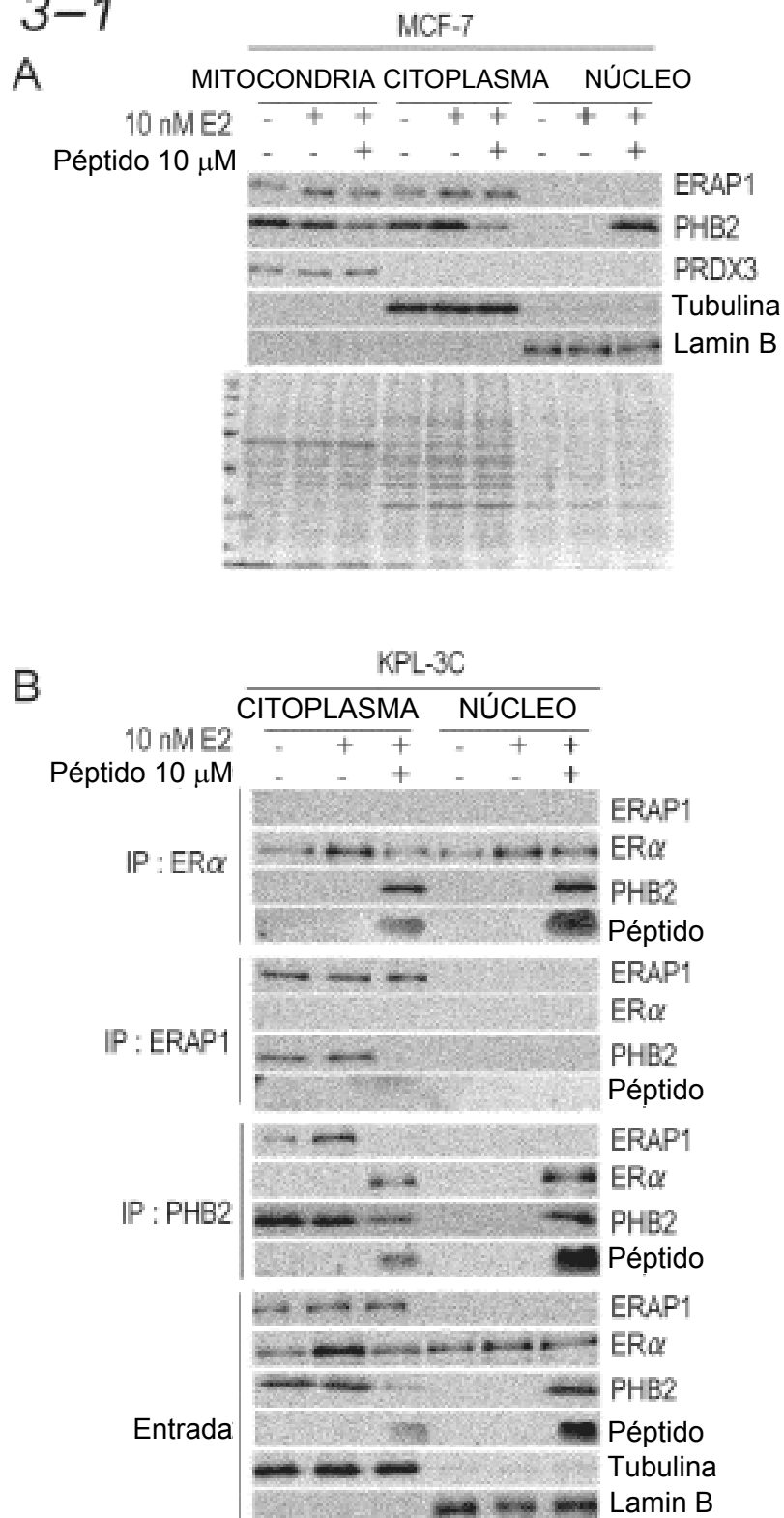


FIG. 3-2

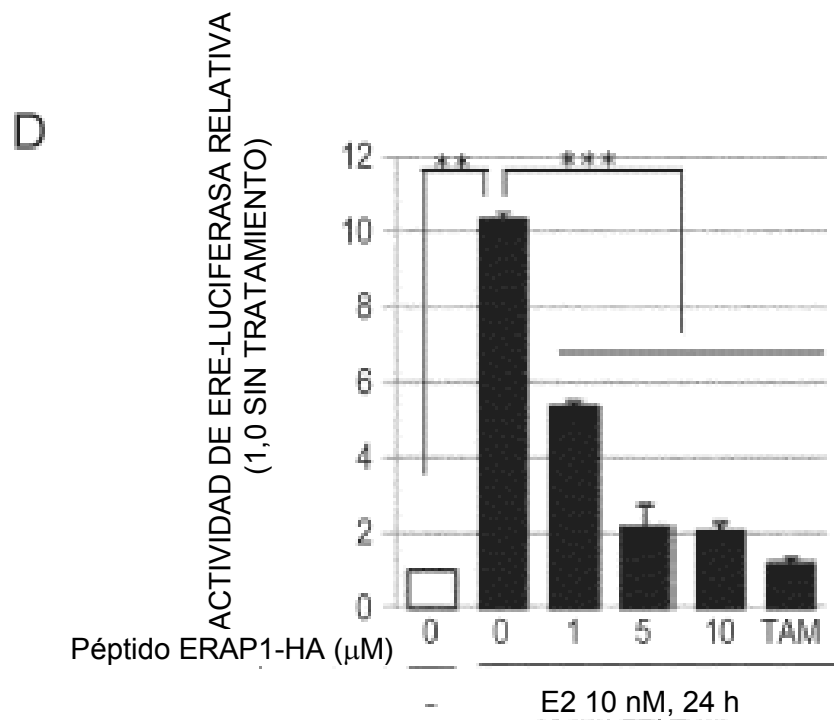
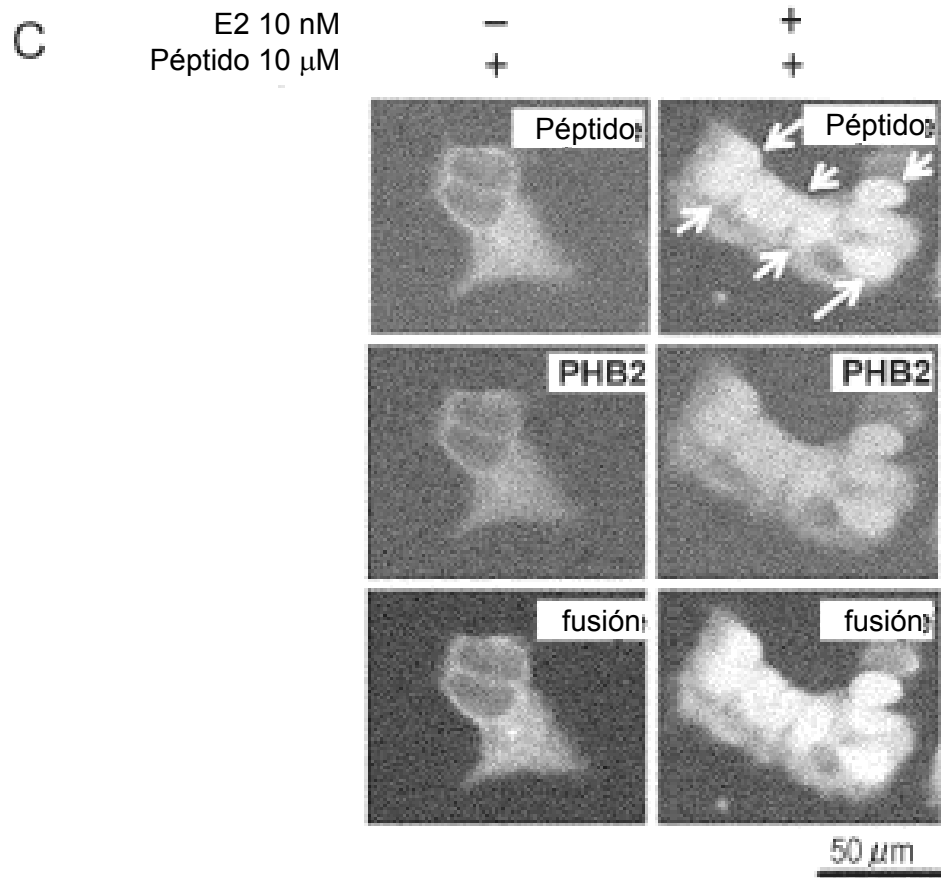
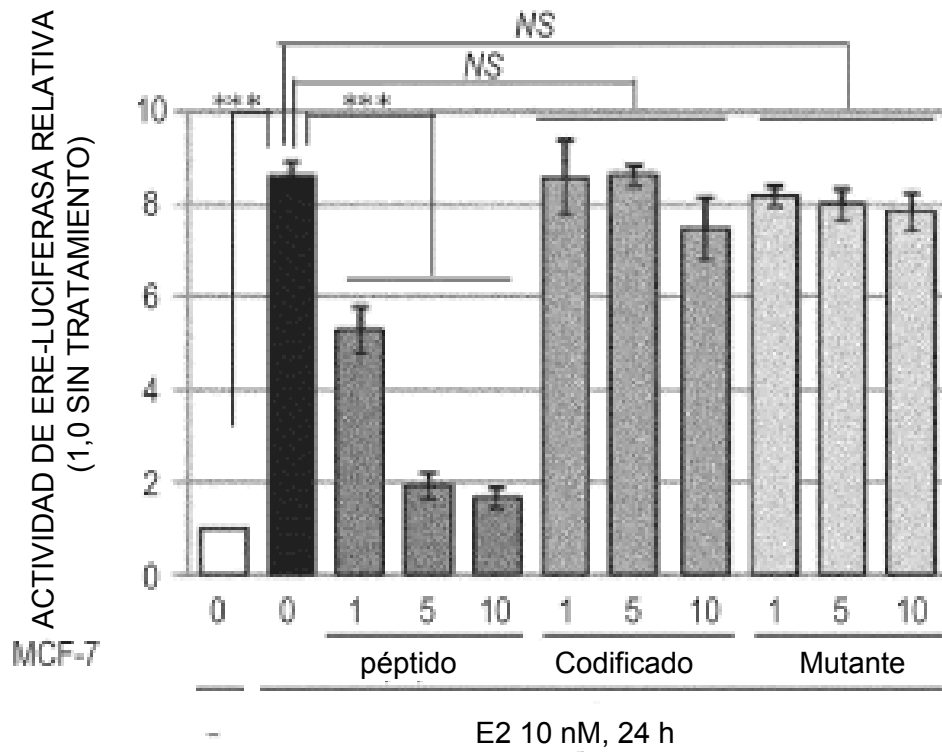


FIG. 3-3

E



F

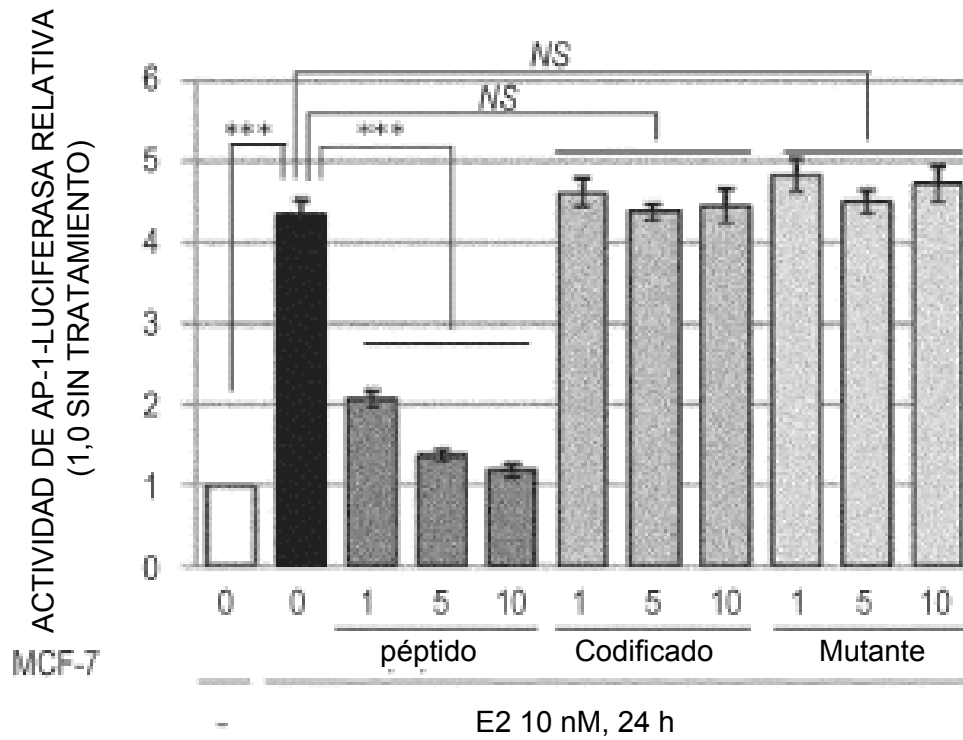


FIG. 3-4

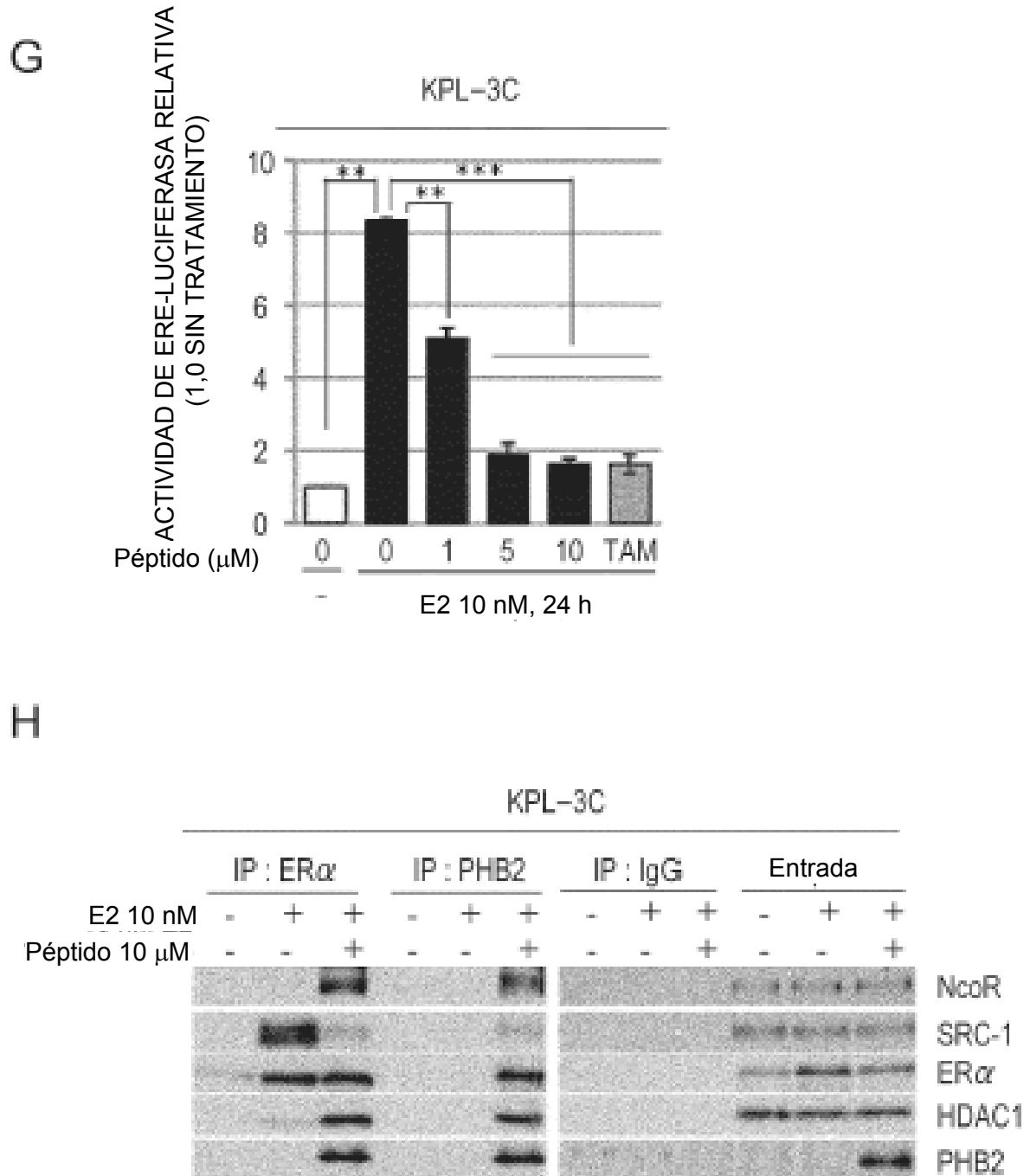


FIG. 4-1

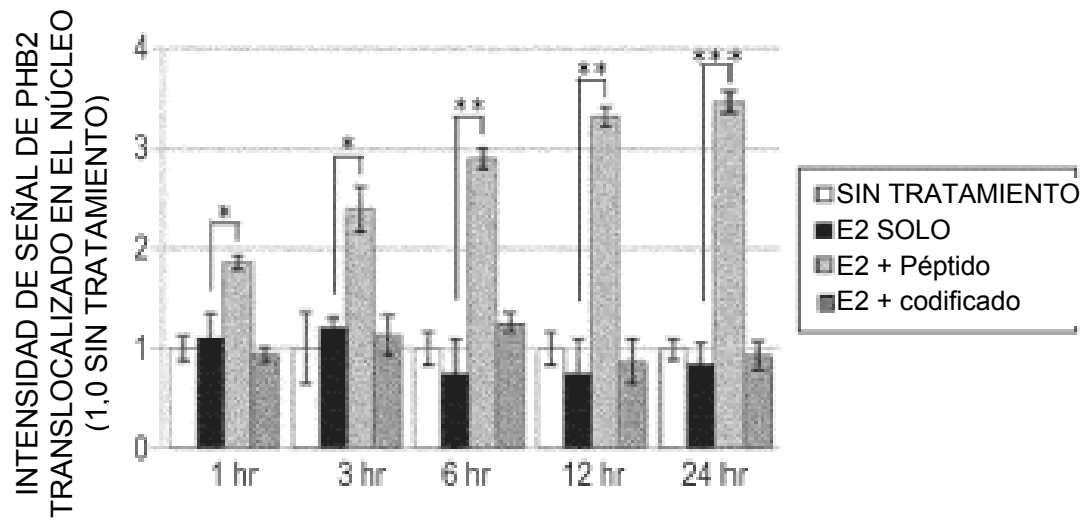
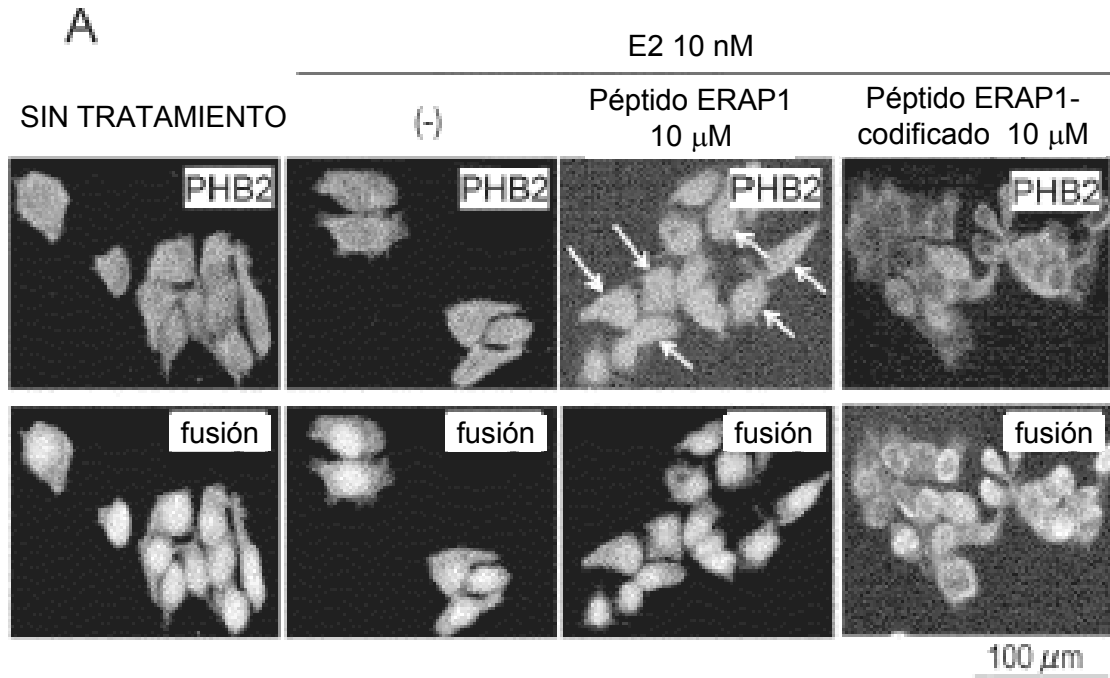


FIG. 4-2

B

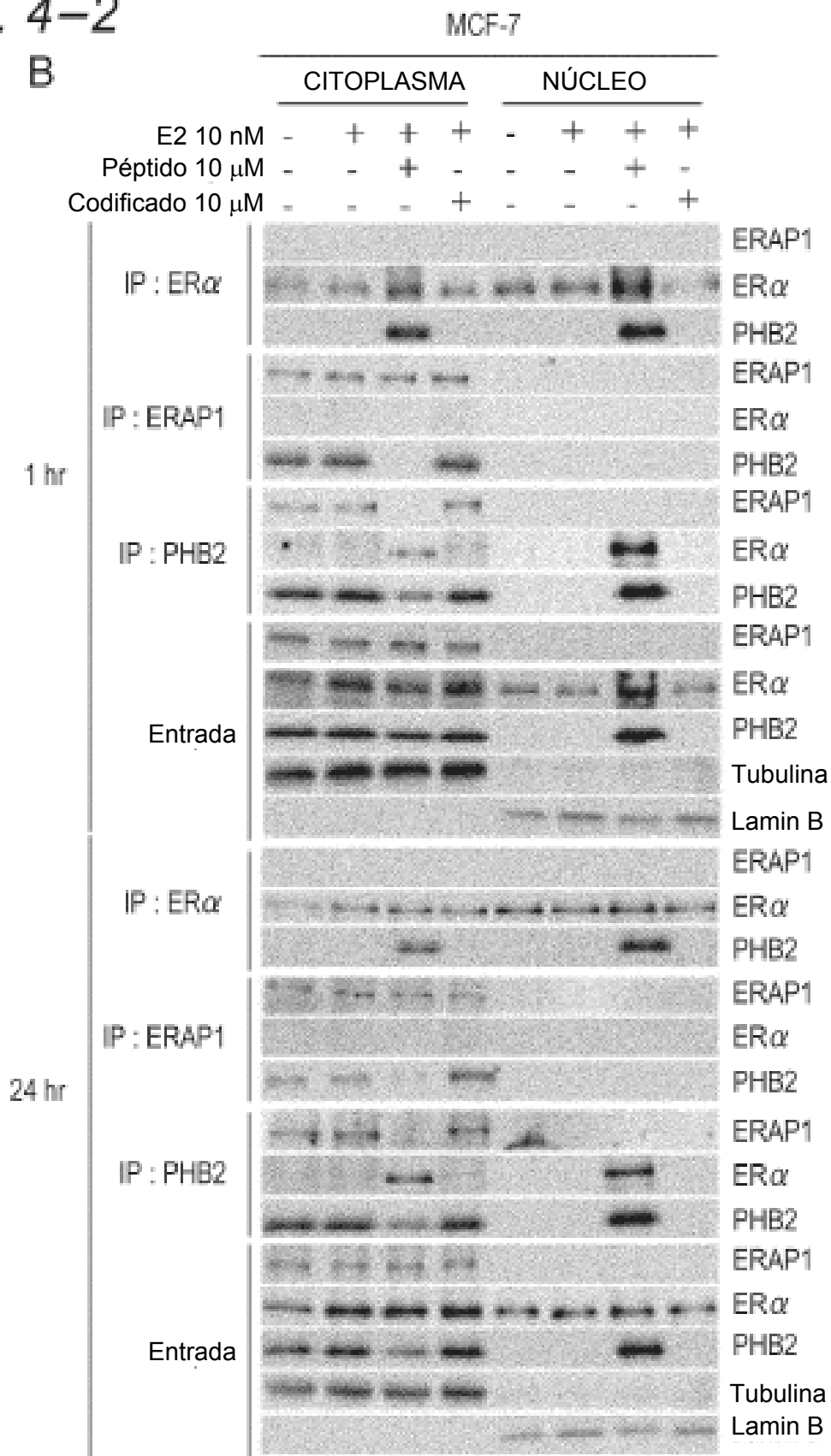


FIG. 4-3

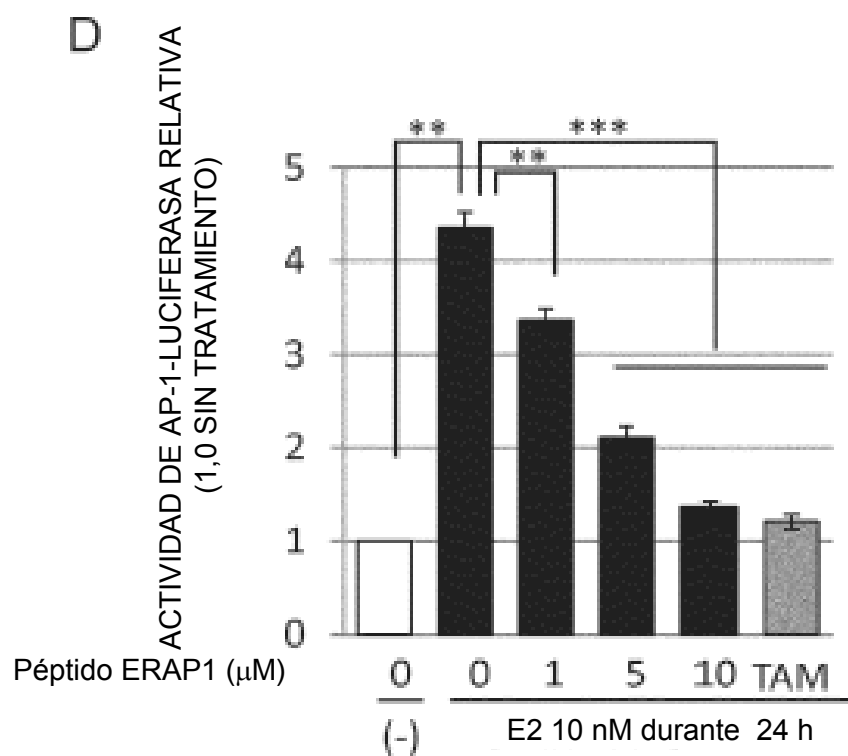
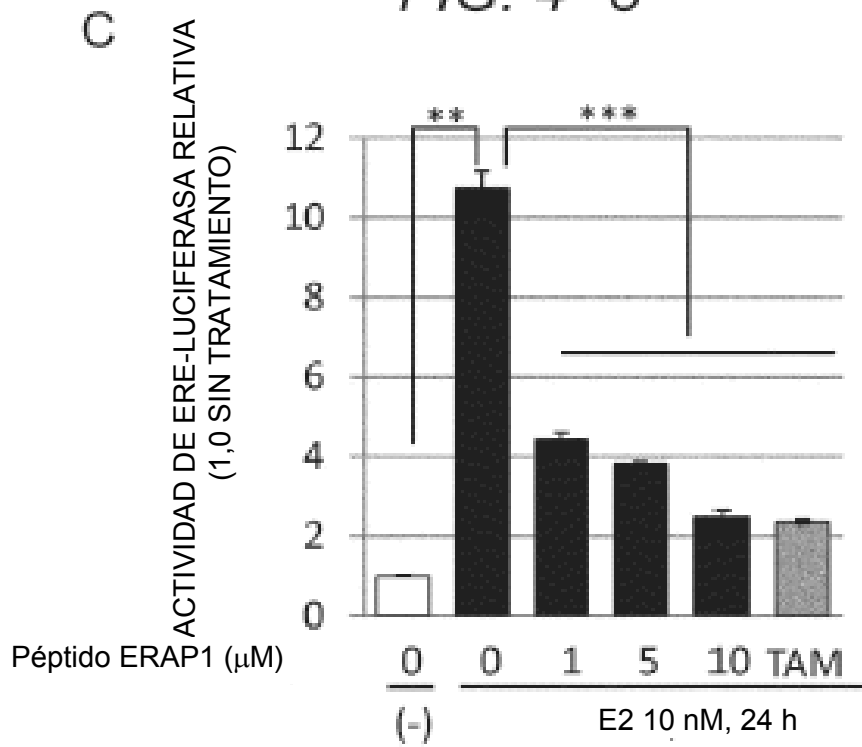
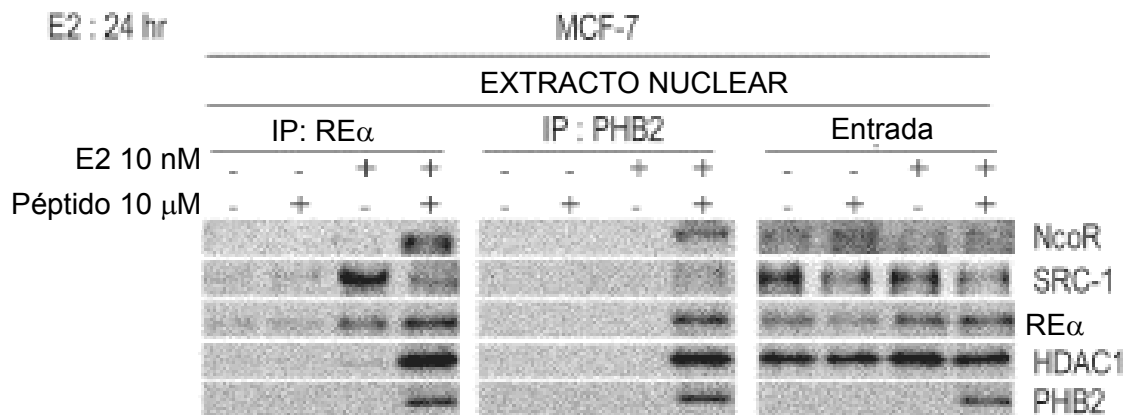


FIG. 4-4

E



F

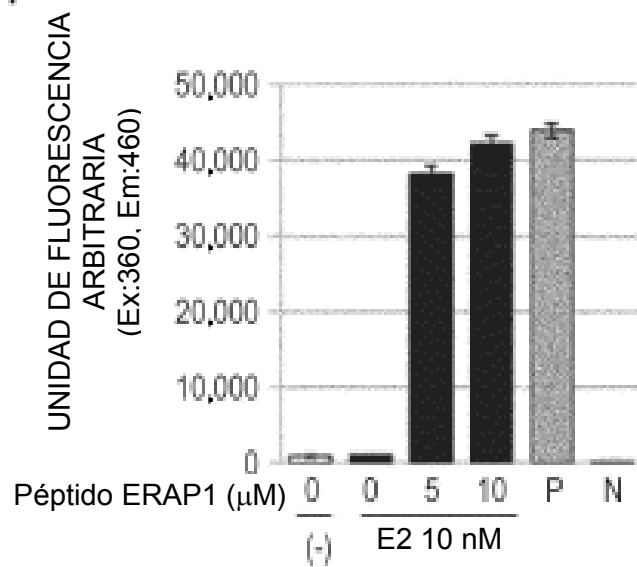


FIG. 4-5

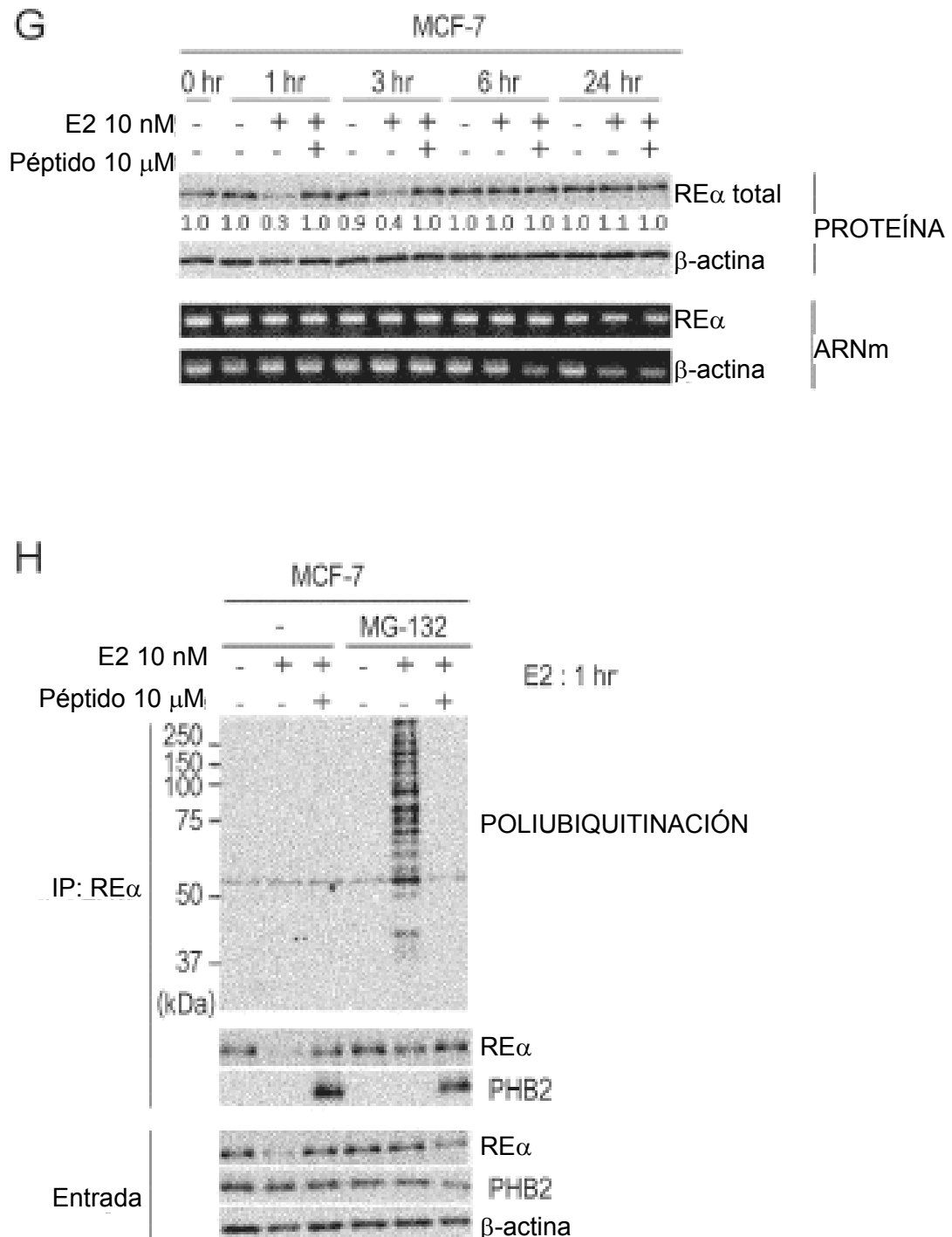


FIG. 5

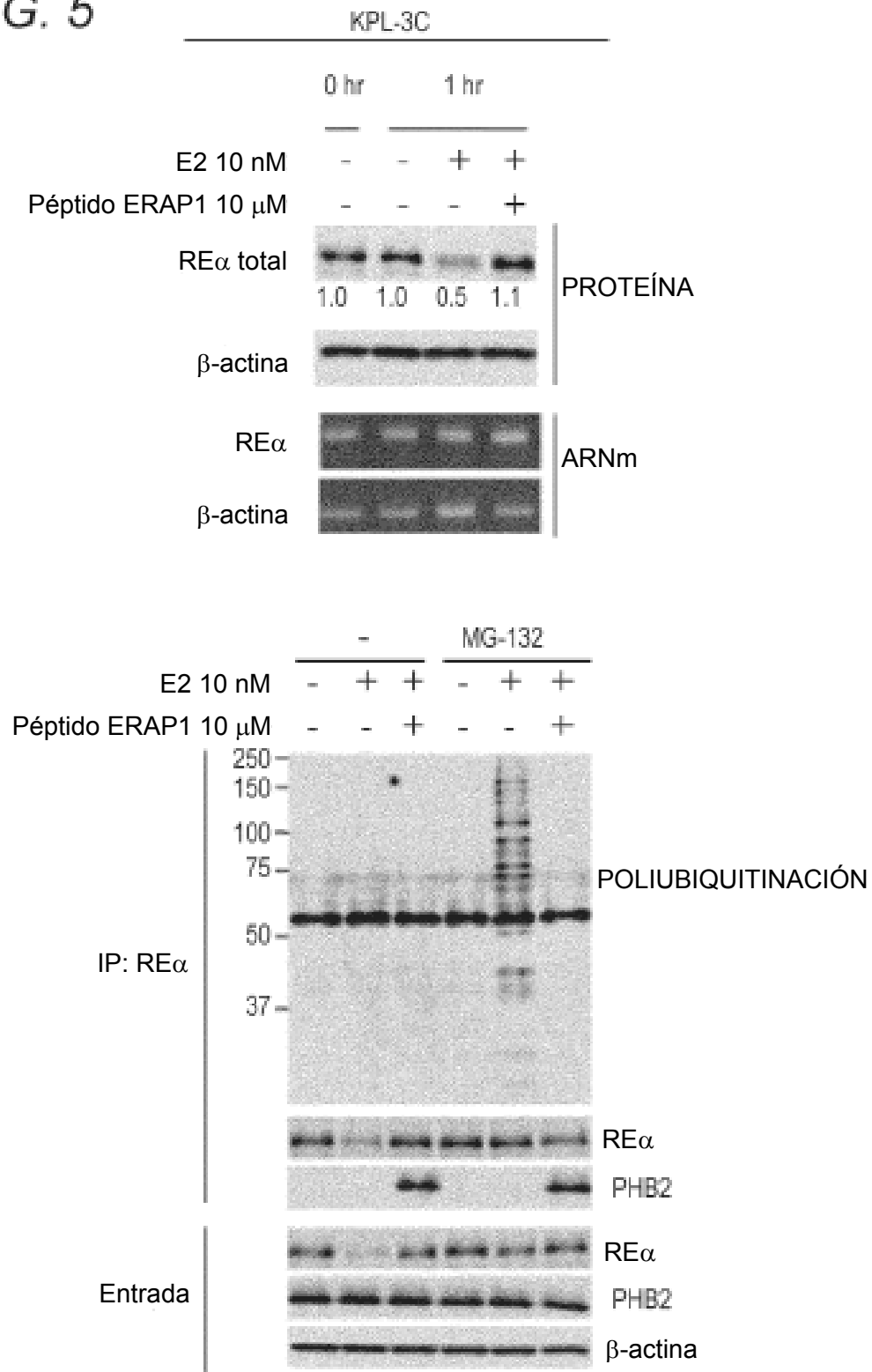
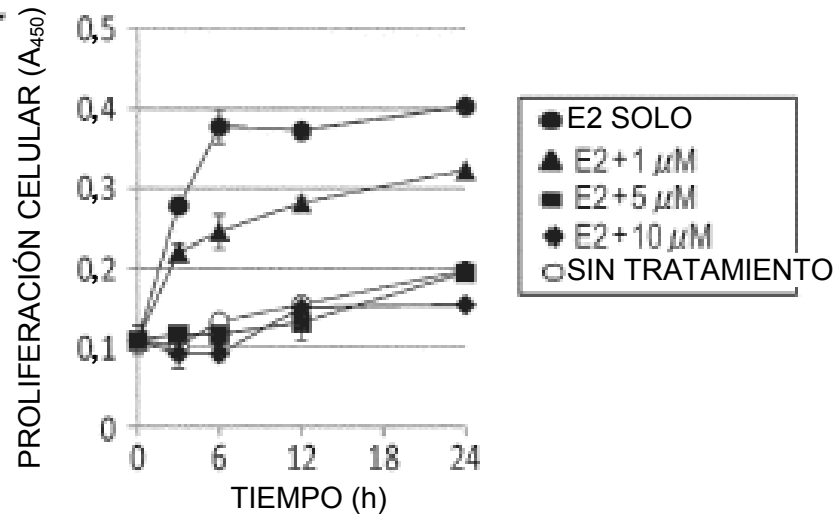
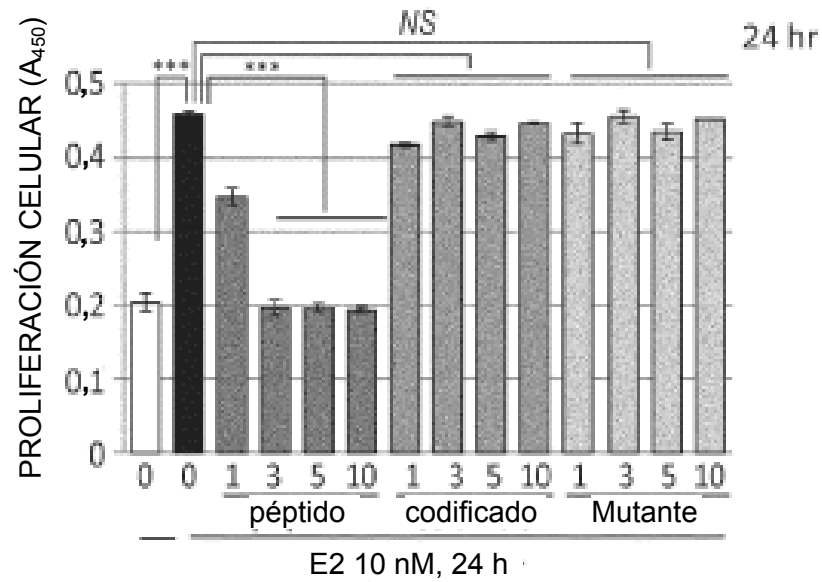


FIG. 6—
A



B



C

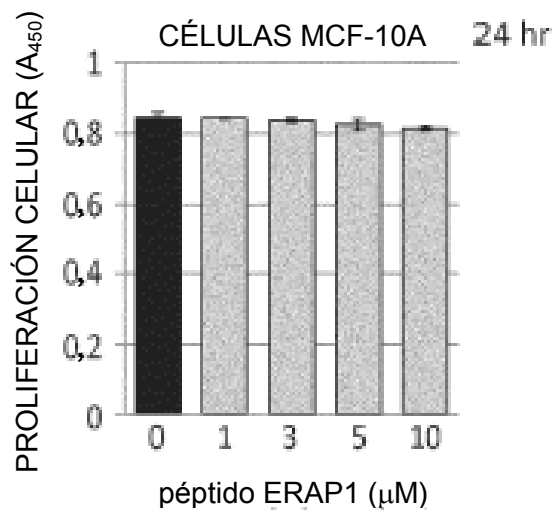


FIG. 6-2

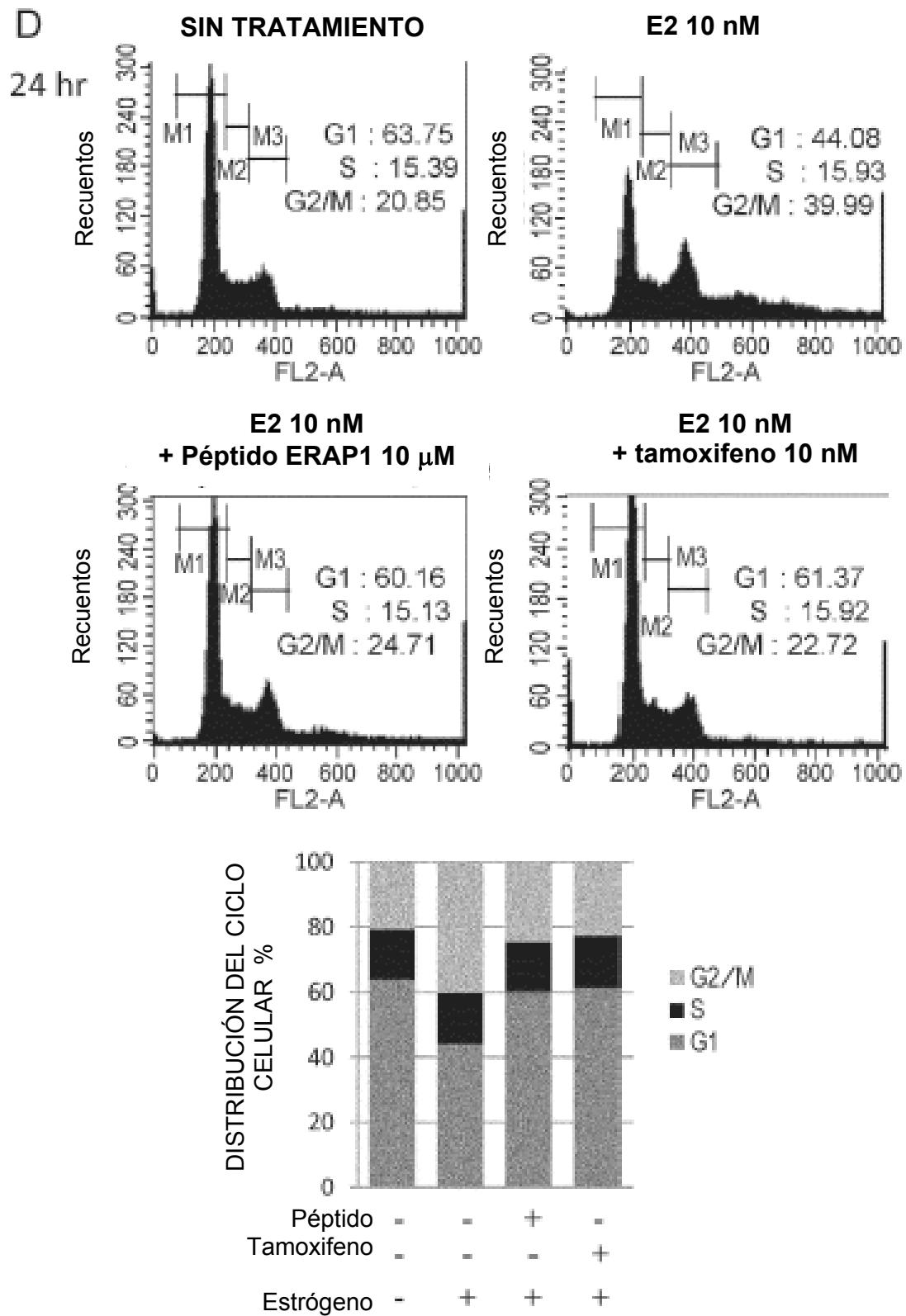
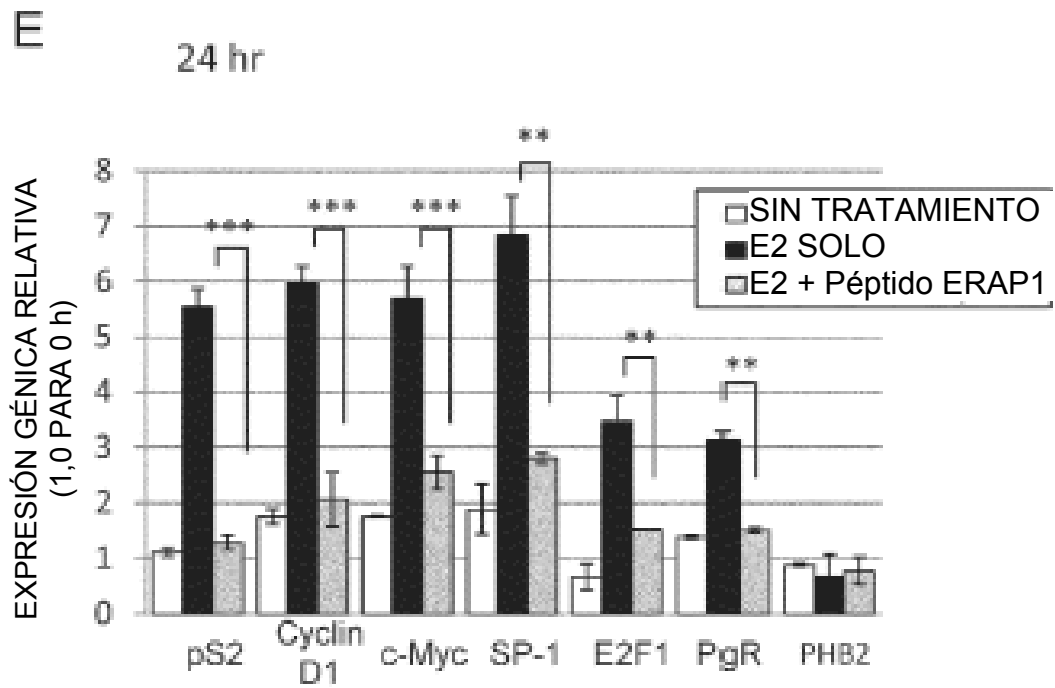


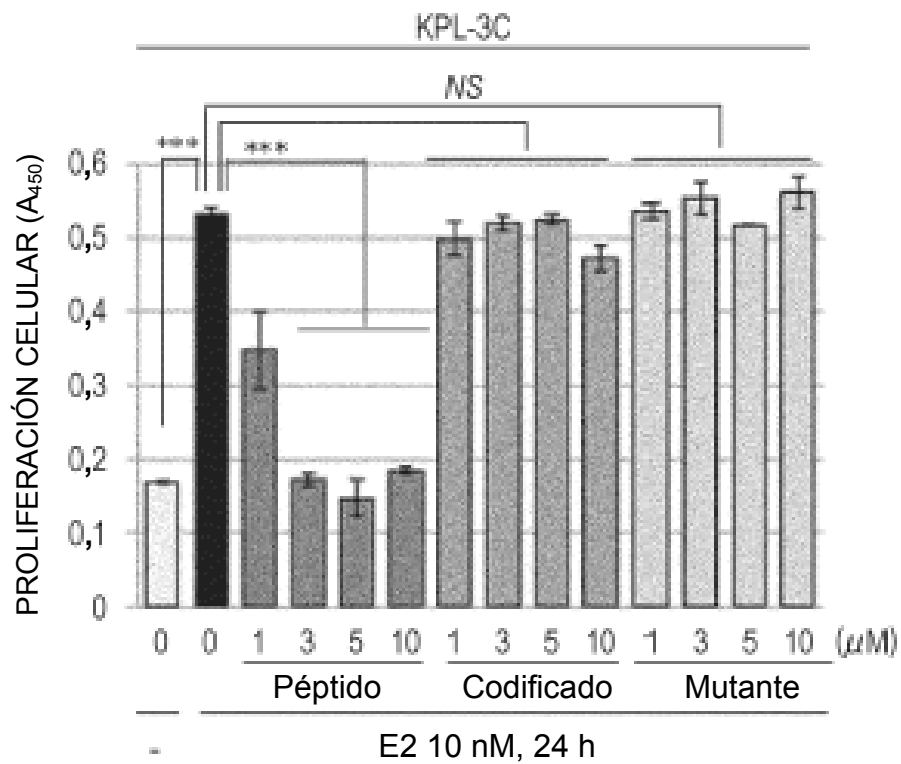
FIG. 6-3



	pS2	Cyclin D1	C-Myc	SP-1	E2F1	PgR
VELOCIDAD INHIBICIÓN Péptido	95	93	80	81	69	93

FIG. 7-1

A



B

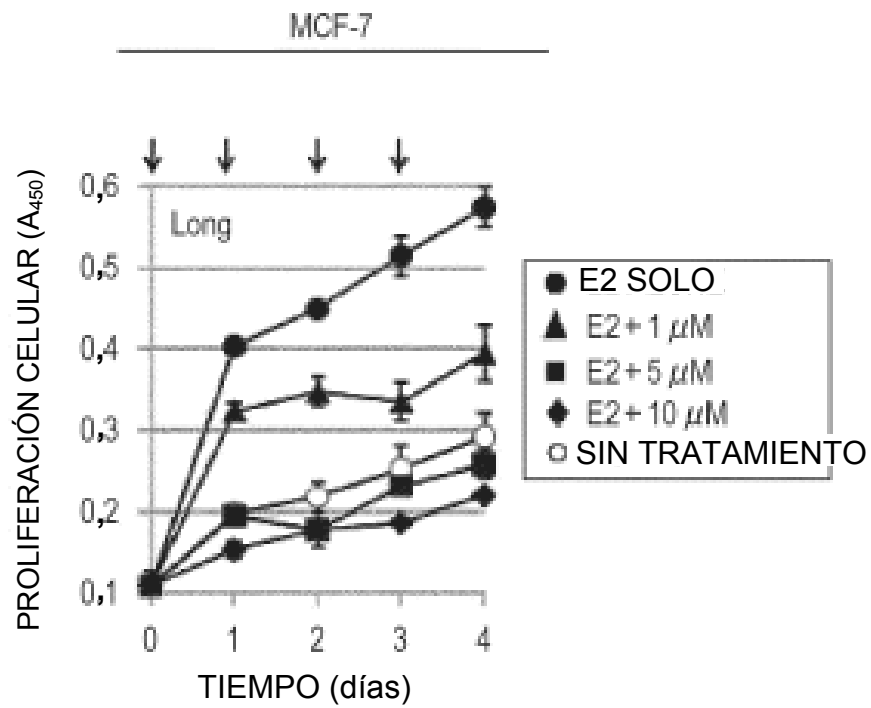


FIG. 7-2

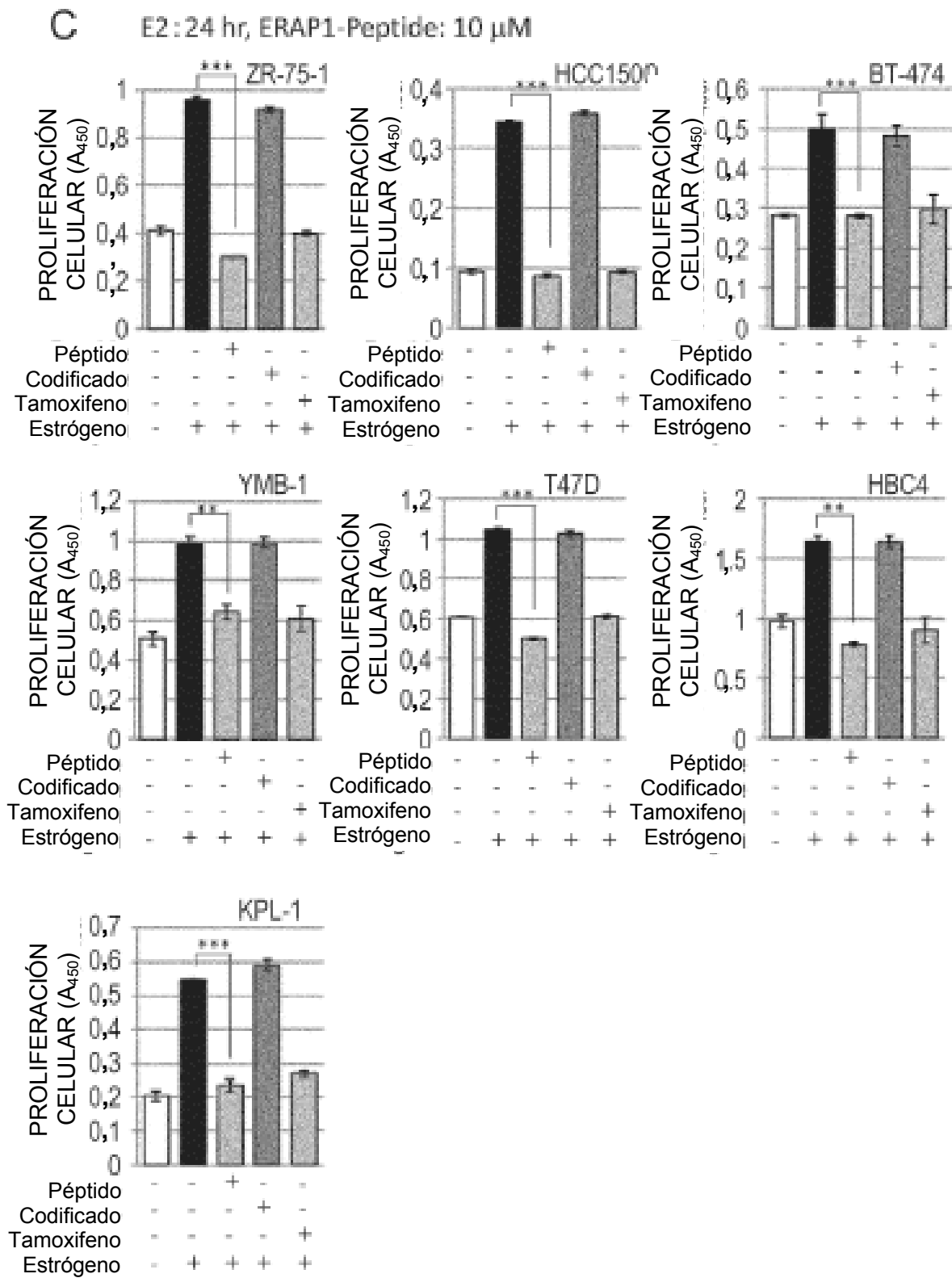
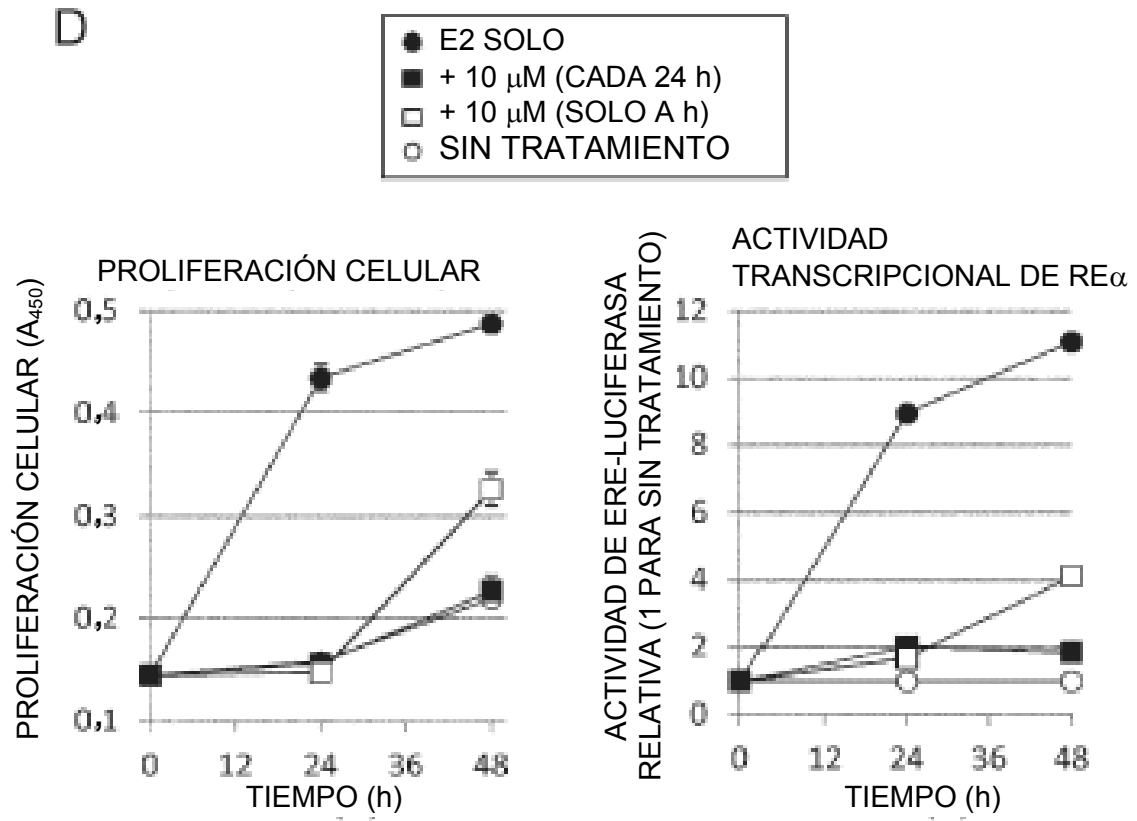


FIG. 7-3



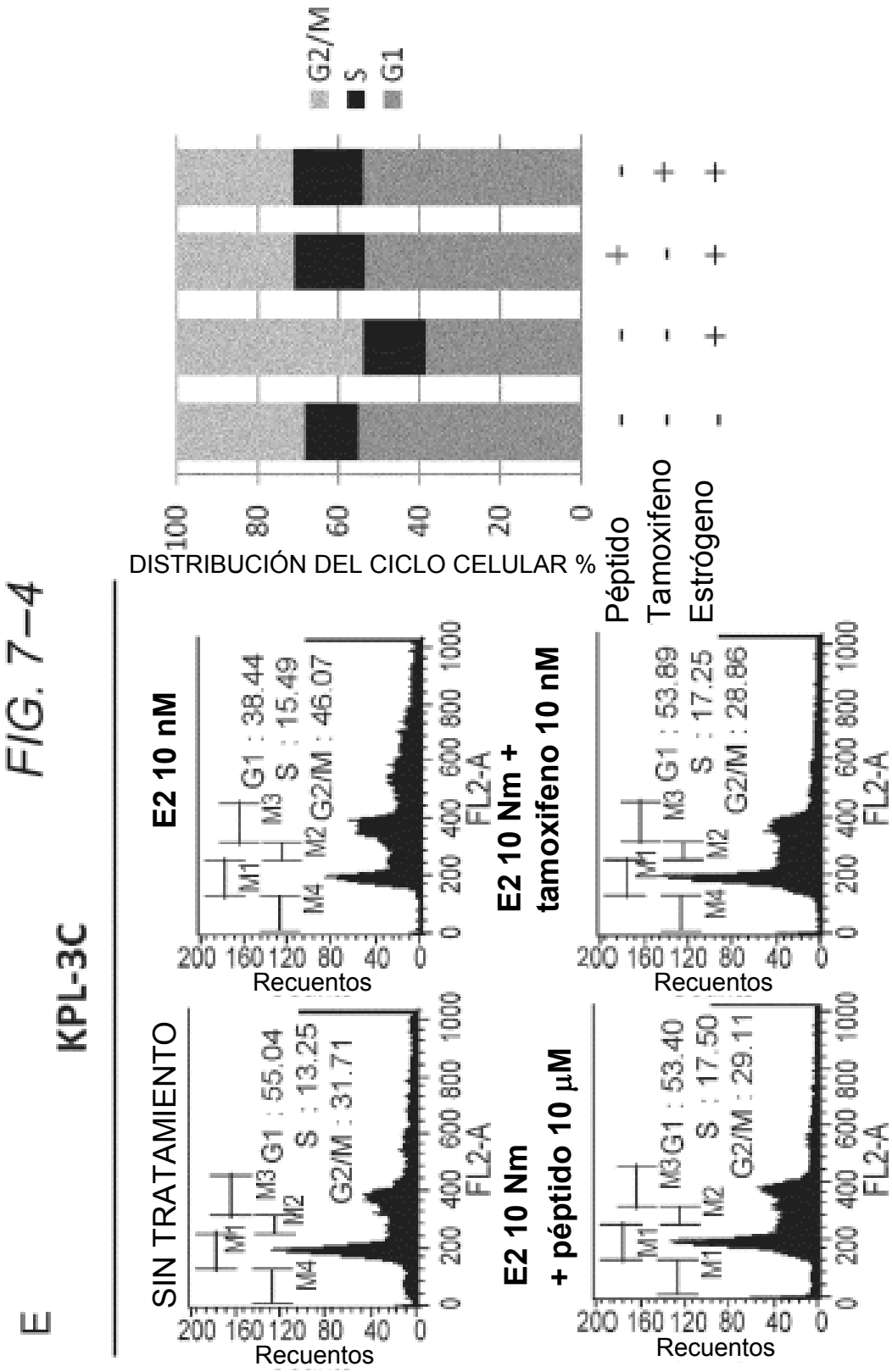


FIG. 8-1

24/67

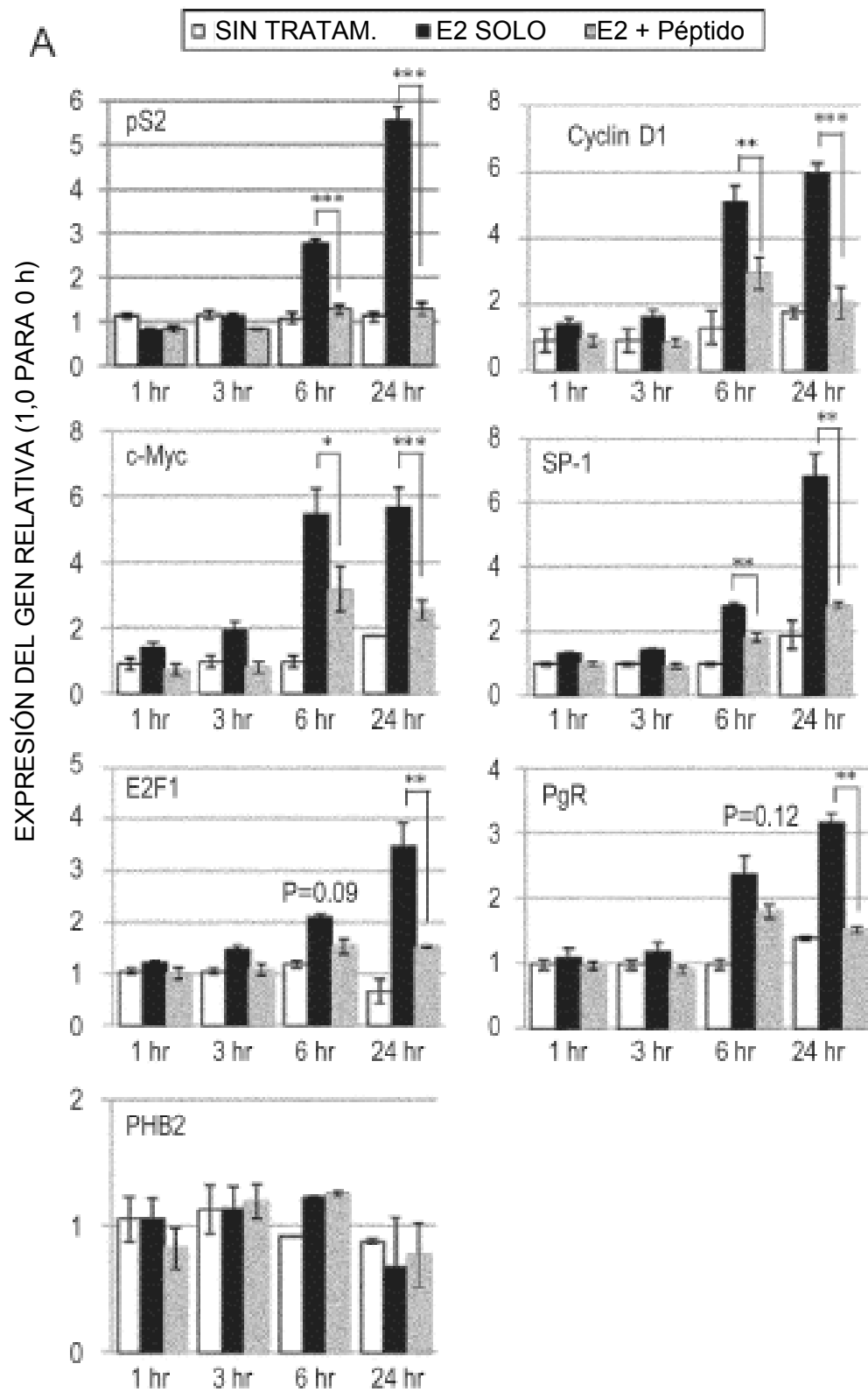
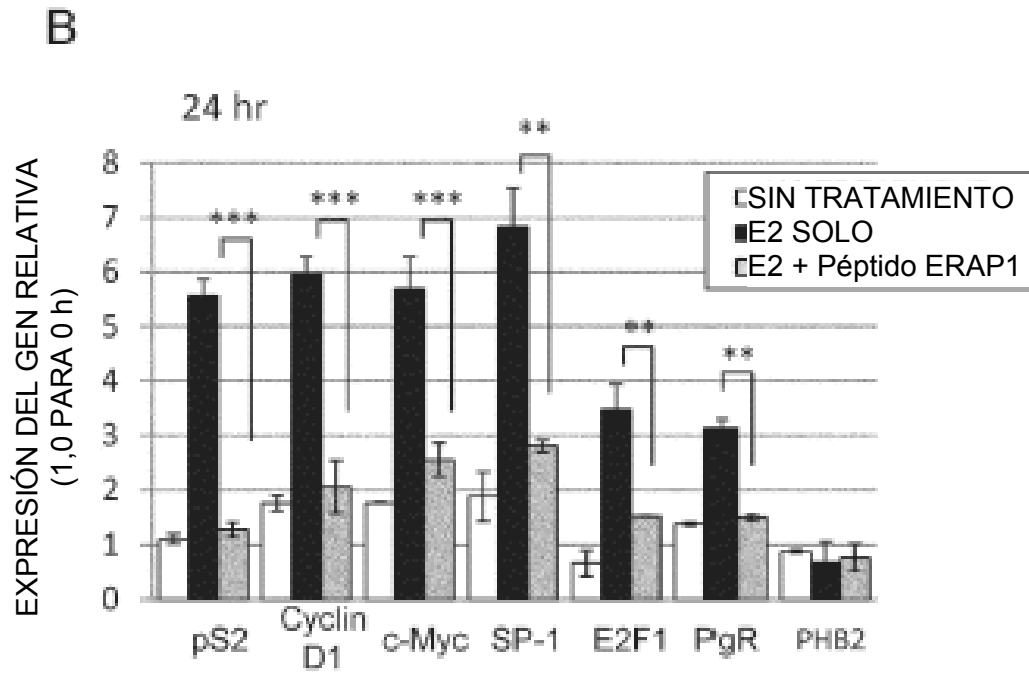


FIG. 8-2



	pS2	Cyclin D1	C-Myc	SP-1	E2F1	PgR
VELOCIDAD DE INHIBICIÓN péptido	95	93	80	81	69	93

FIG. 9-1

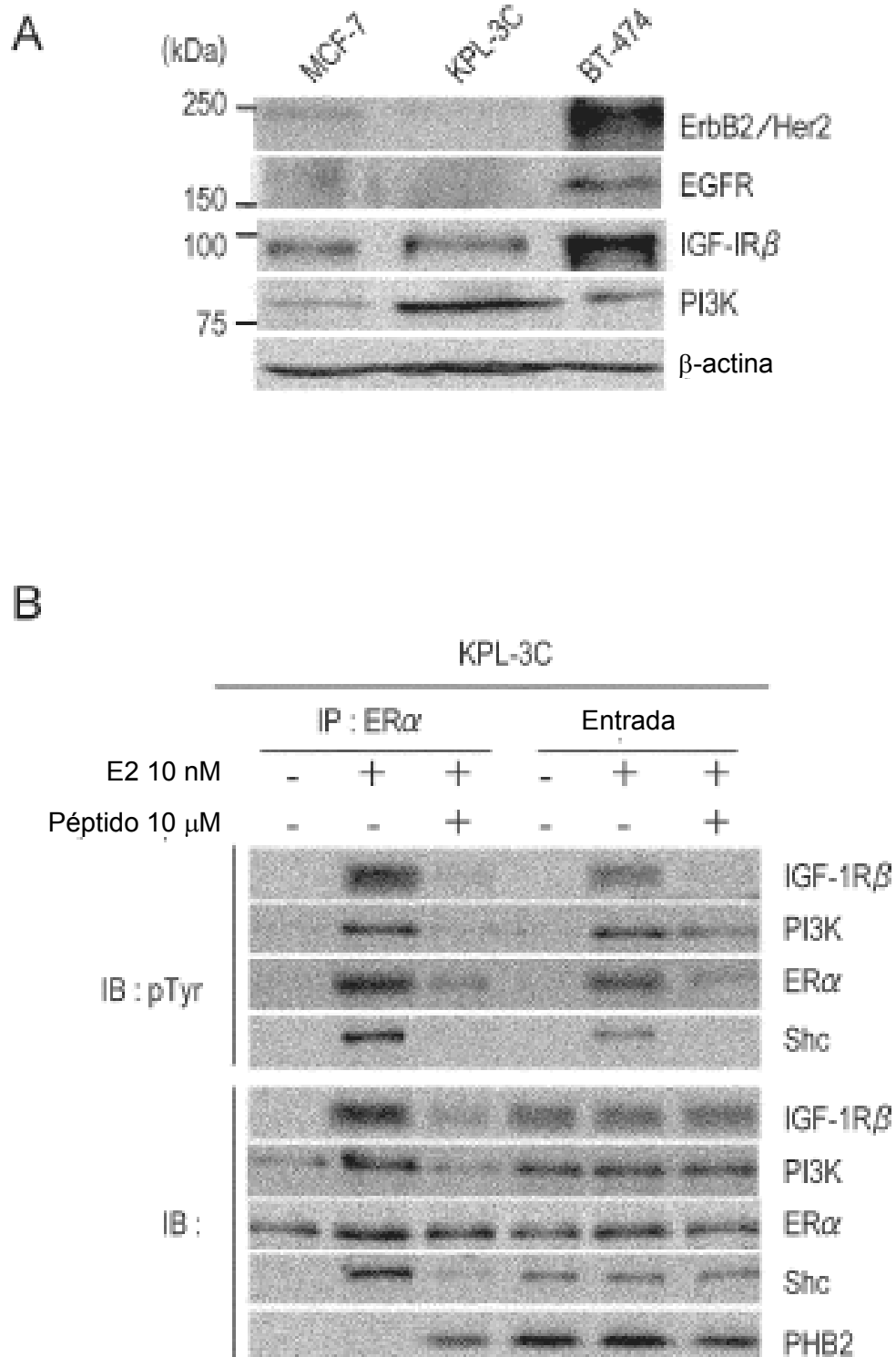


FIG. 9-2

27/67

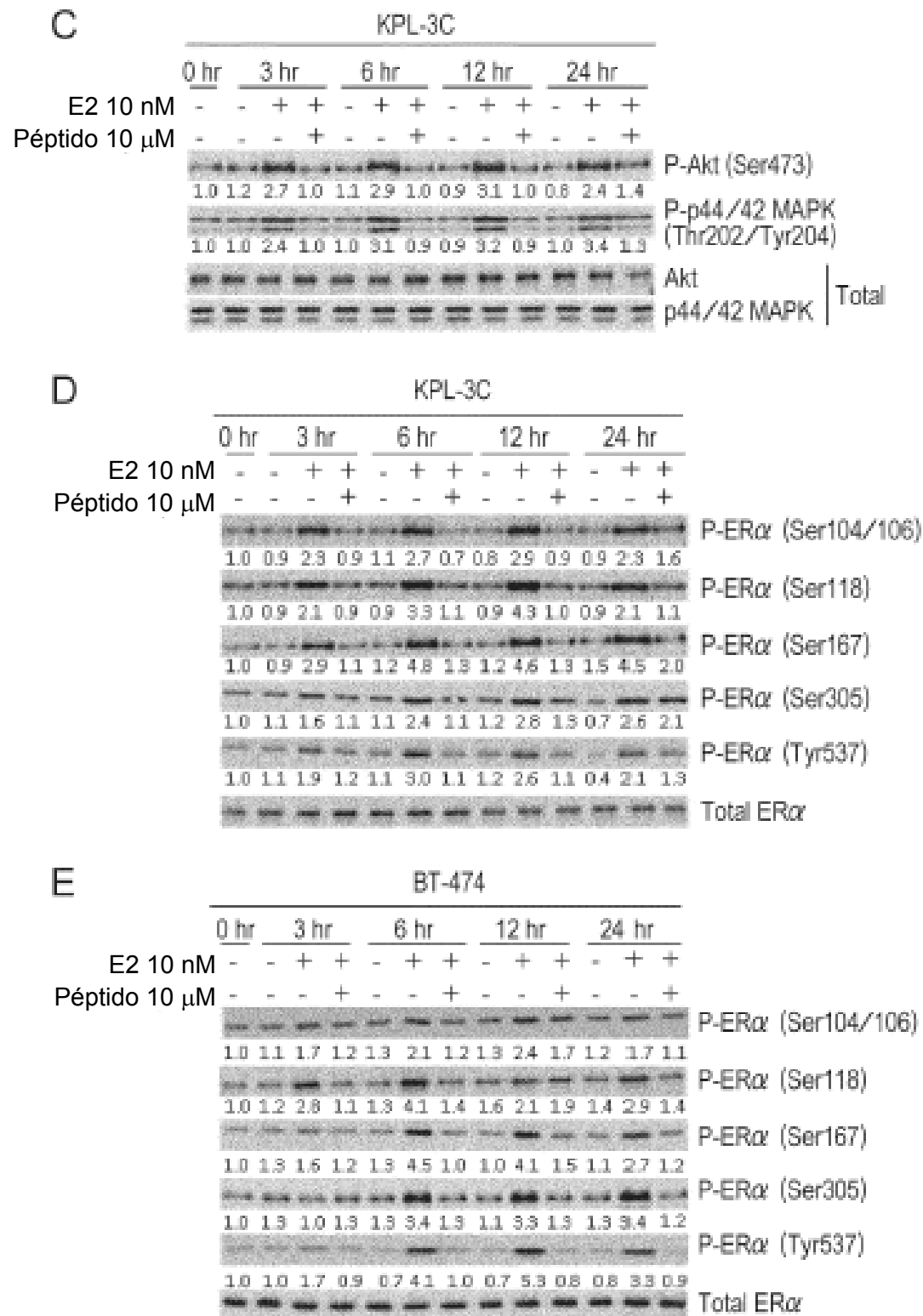


FIG. 10-1

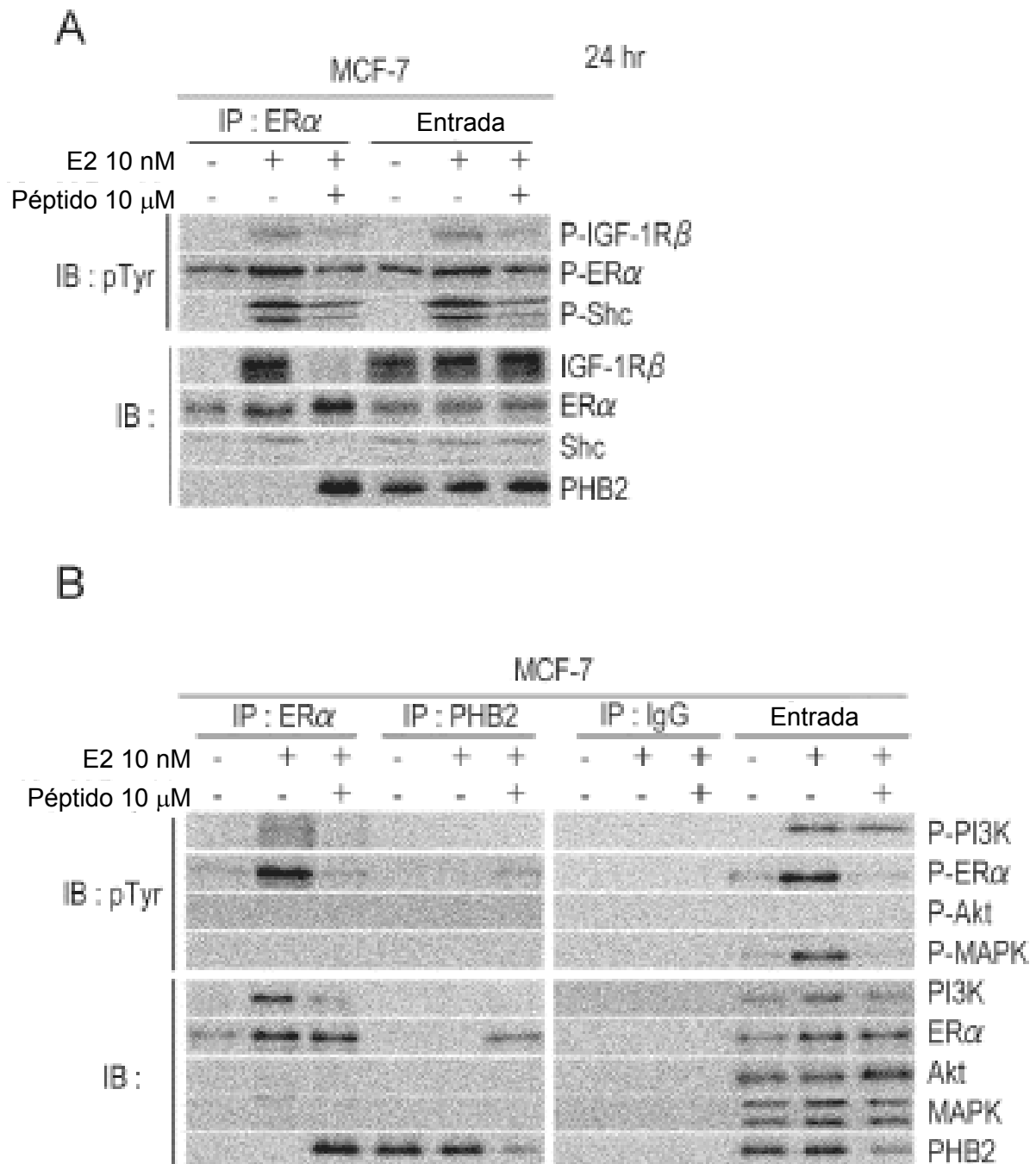


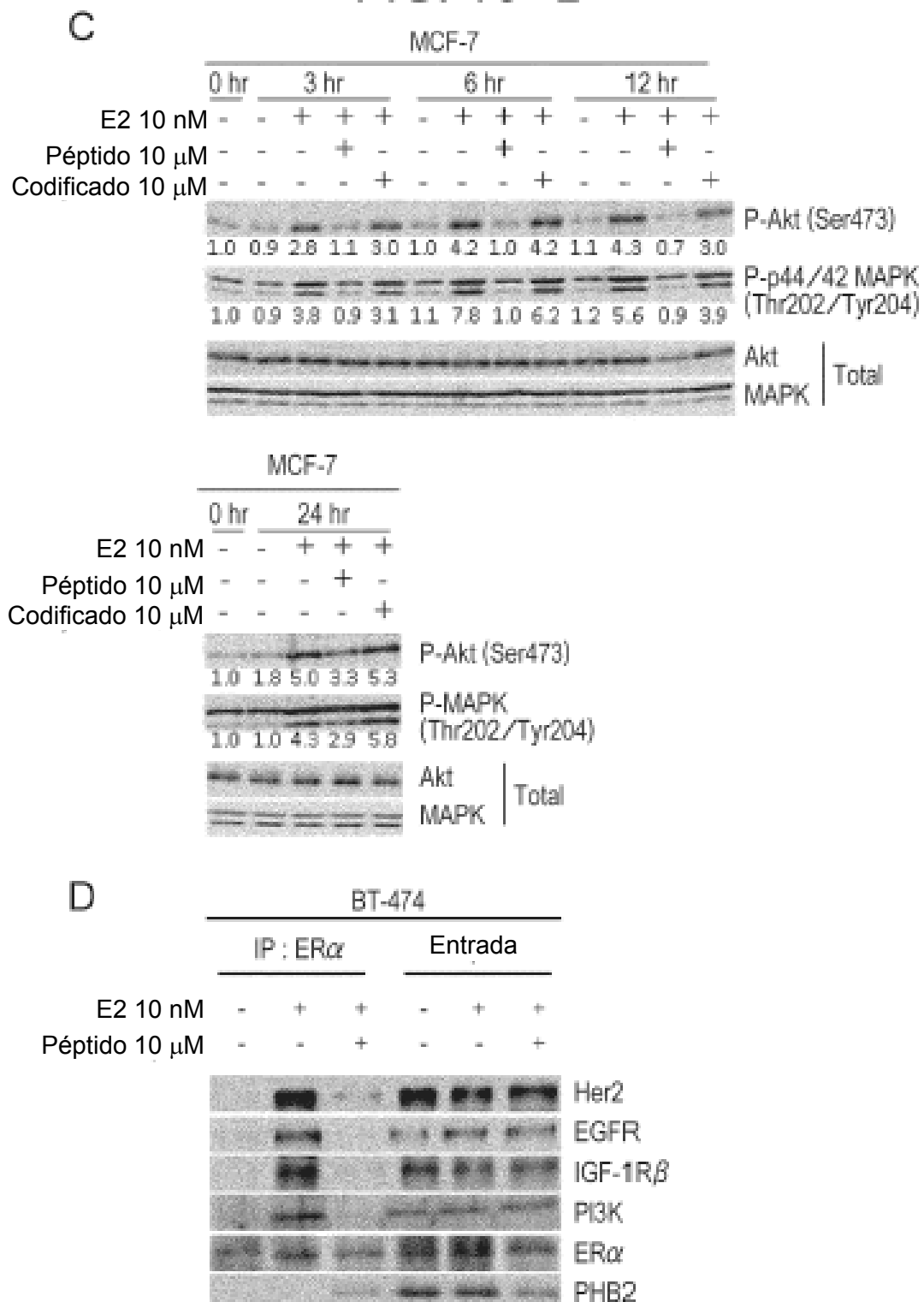
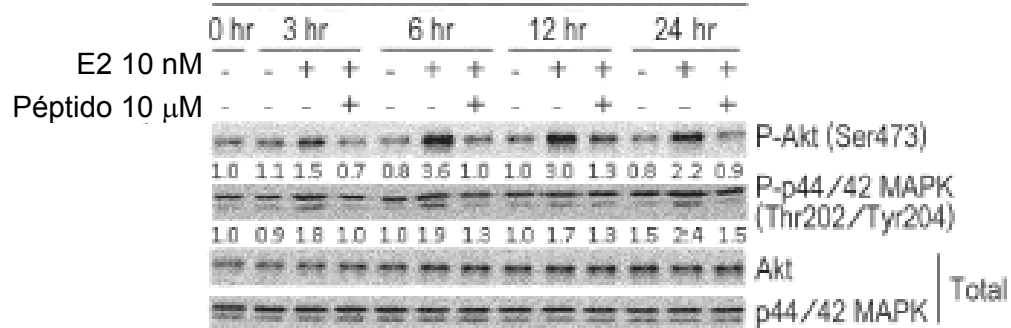
FIG. 10-2

FIG. 10-3

30/67

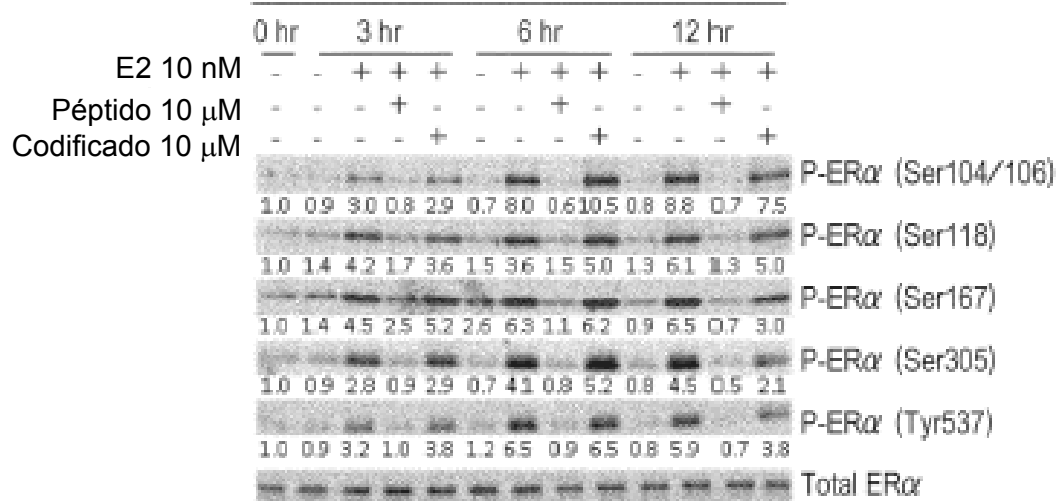
E

BT-474



F

MCF-7



MCF-7

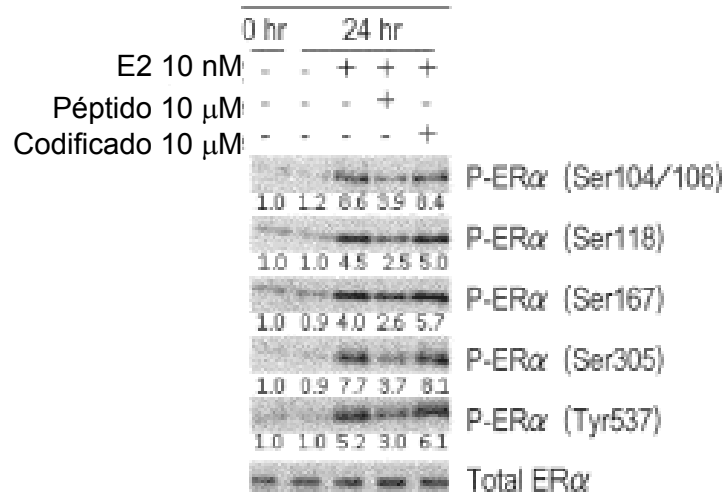
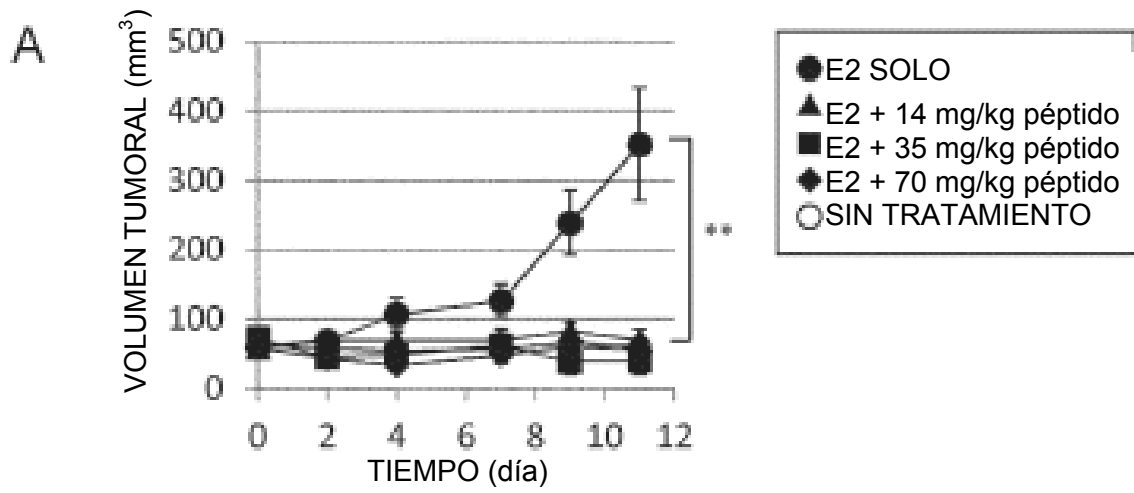
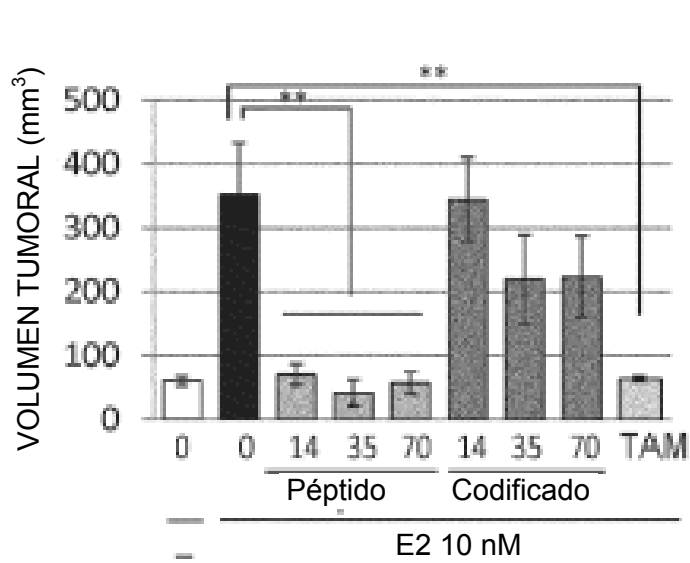


FIG. 11-1

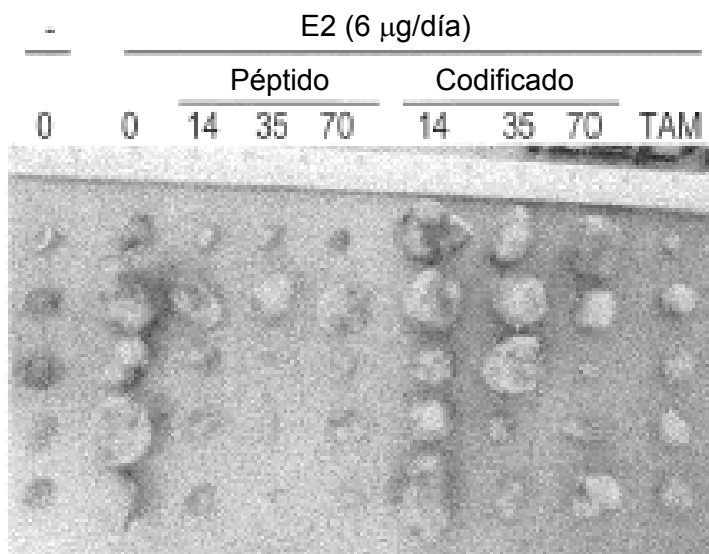


B



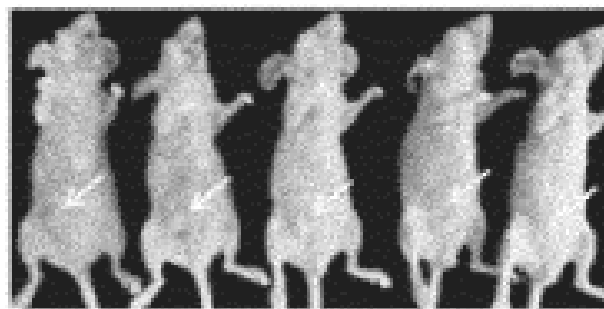
C

FIG. 11-2



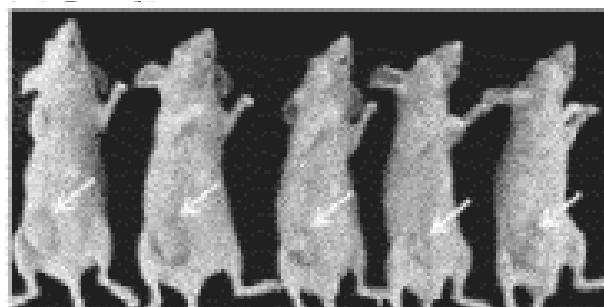
Día 14

SIN TRATAMIENTO



Día 14

E2 (6 µg/día)



Día 14

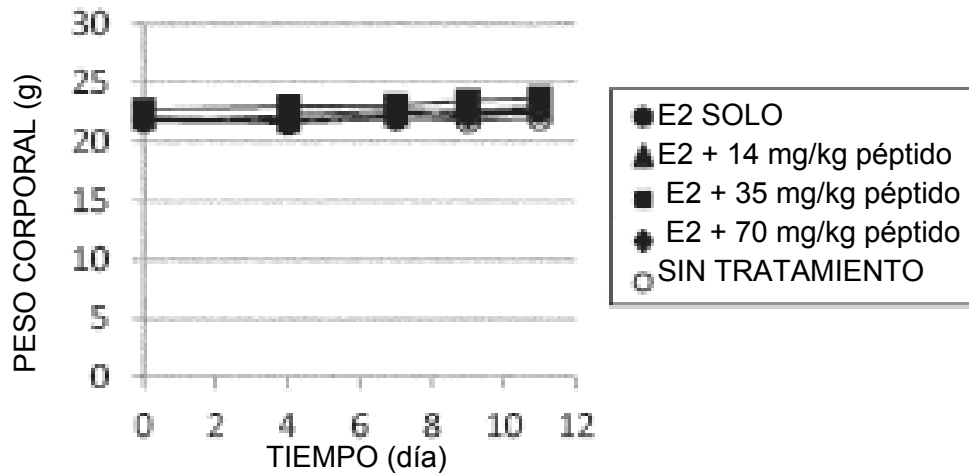
E2 + 14 mg/kg péptido



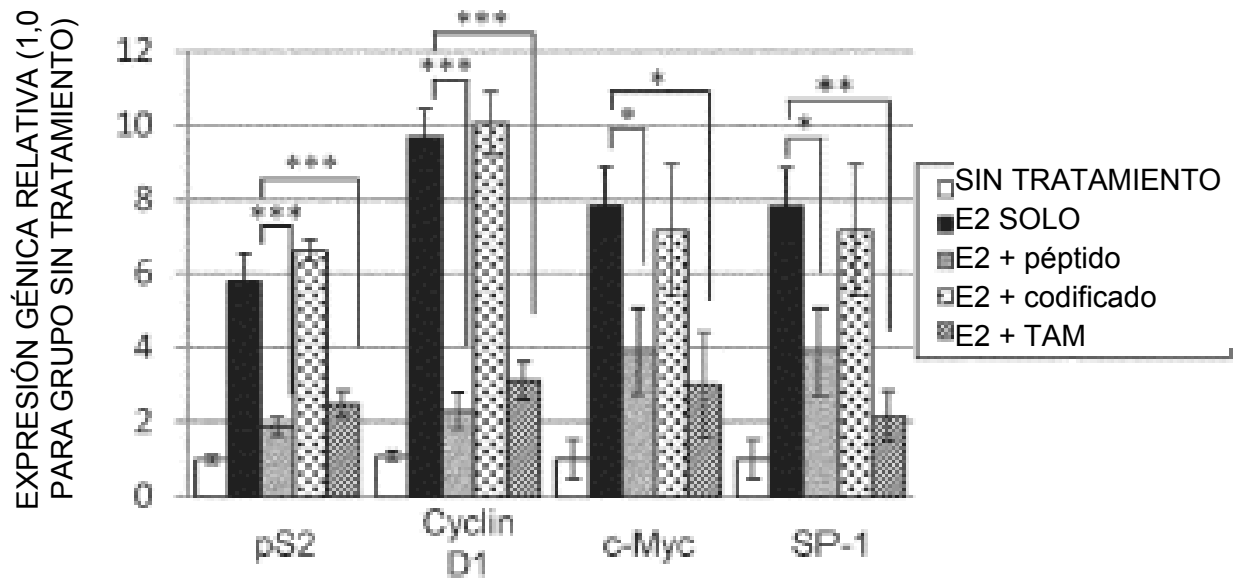
Día 14

FIG. 11-3

D



E



	pS2	Cyclin D1	C-Myc	SP-1
VELOCIDAD DE INHIBICIÓN Péptido	82	86	58	58
VELOCIDAD DE INHIBICIÓN Tamoxifeno	69	76	71	83

FIG. 11-4

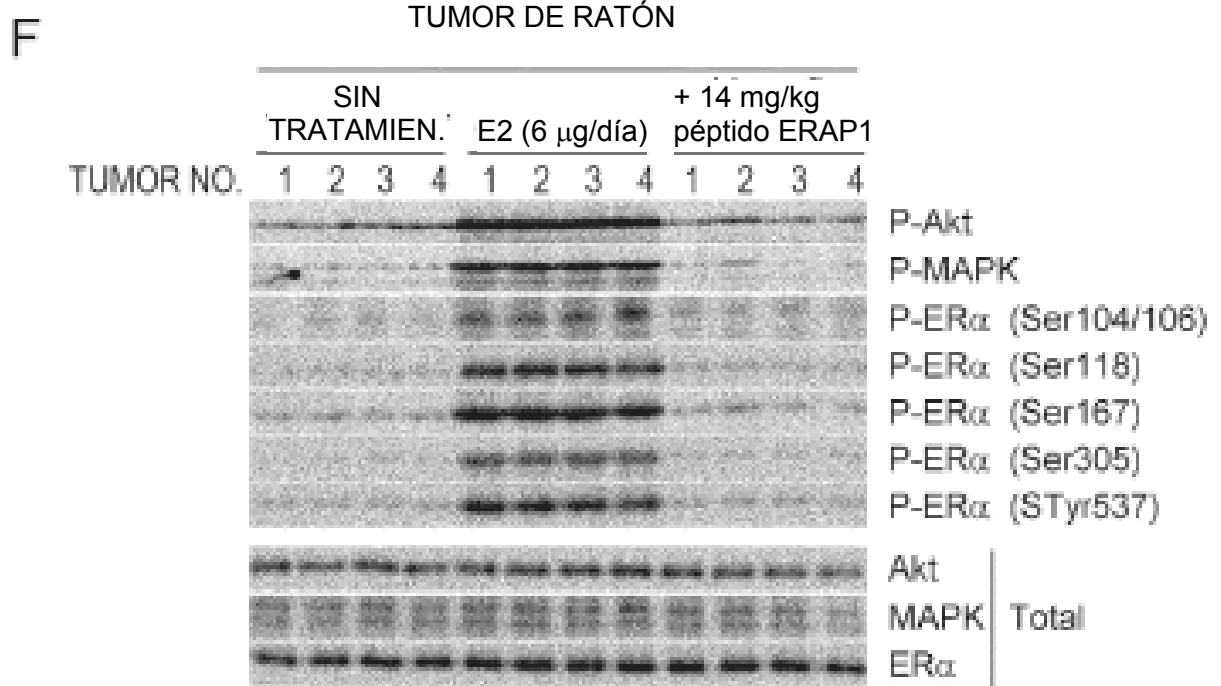


FIG. 12

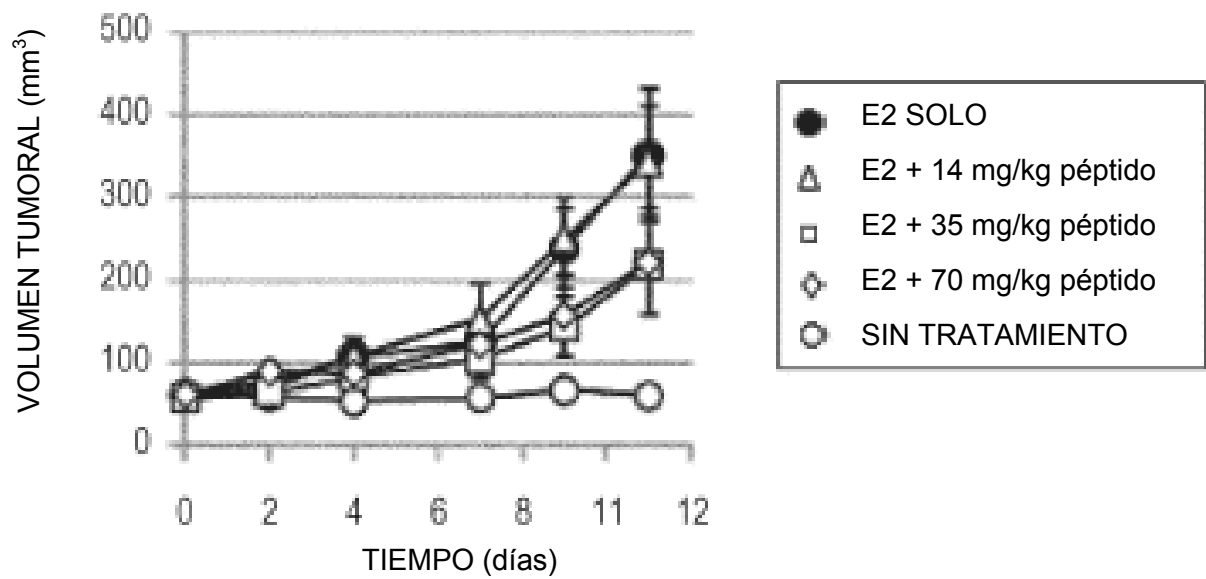
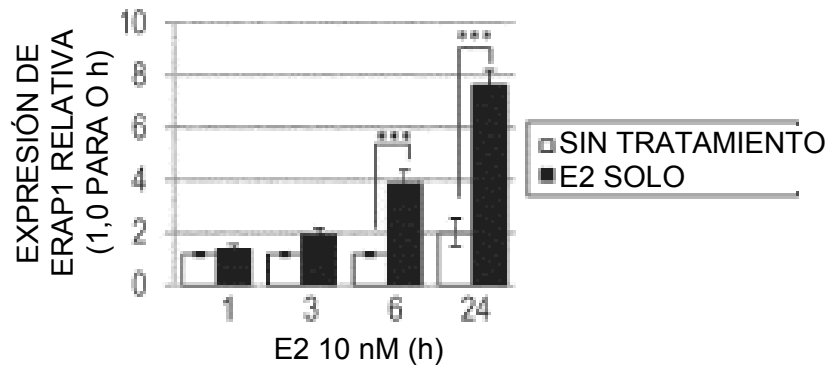


FIG. 13-1

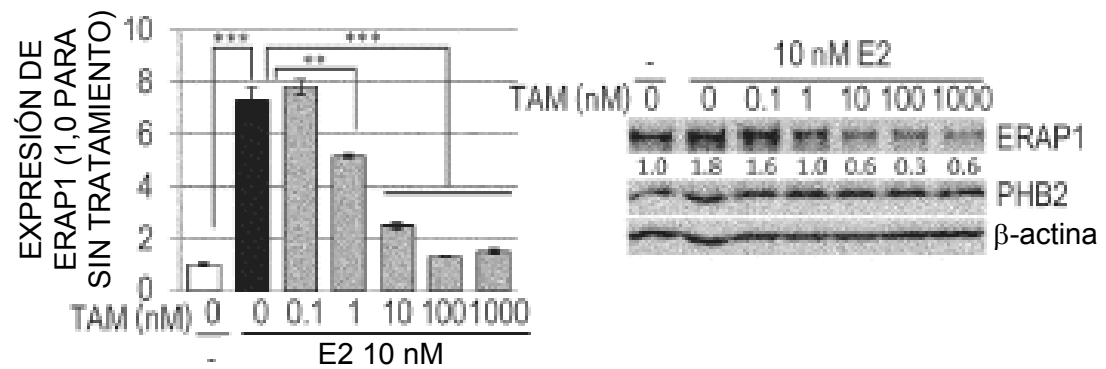
A

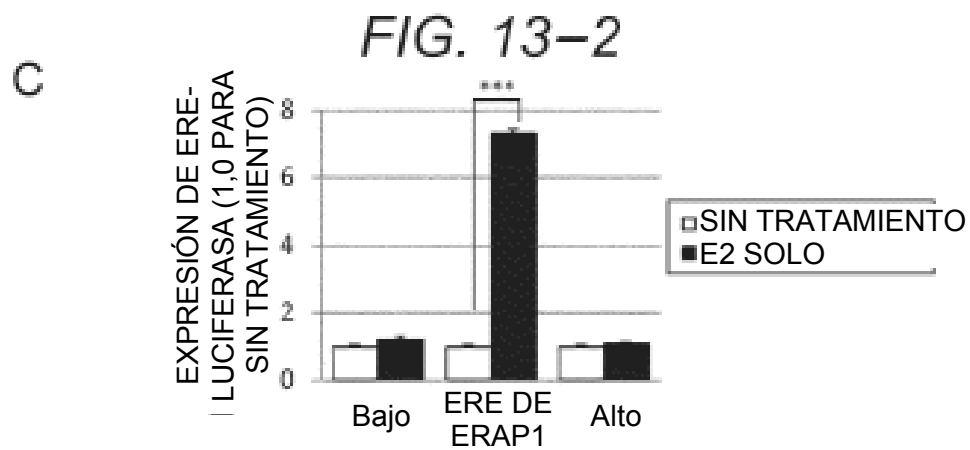


B

PCR A TIEMPO REAL

TRANSFERENCIA WESTERN





SECUENCIA CONSENSO DE ERE EN INTRÓN 1 DE GENOMA ERAP1

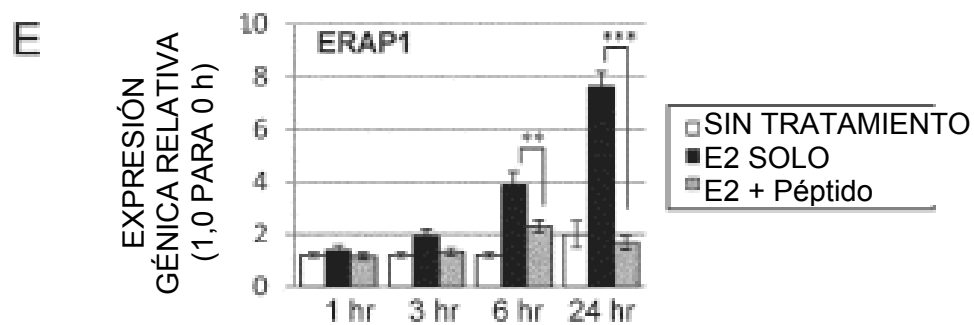
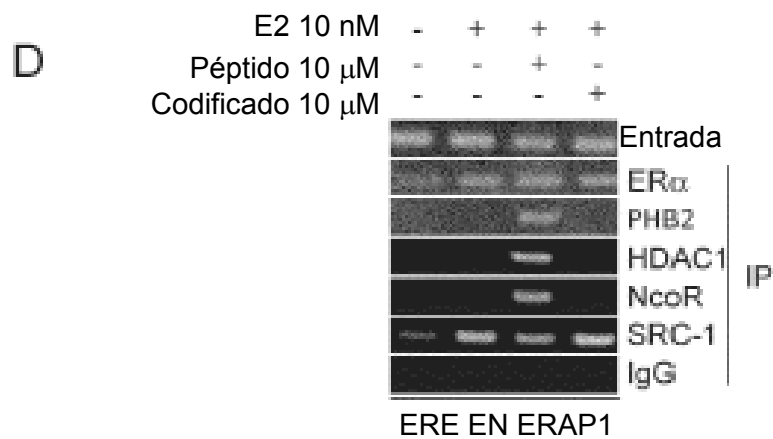
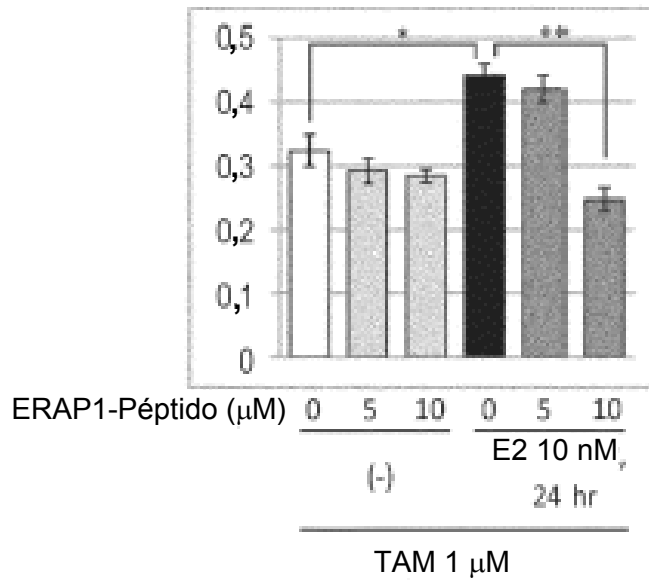


FIG. 14

A

CÉLULAS MCF-7 RESISTENTES A Tamoxifeno



B

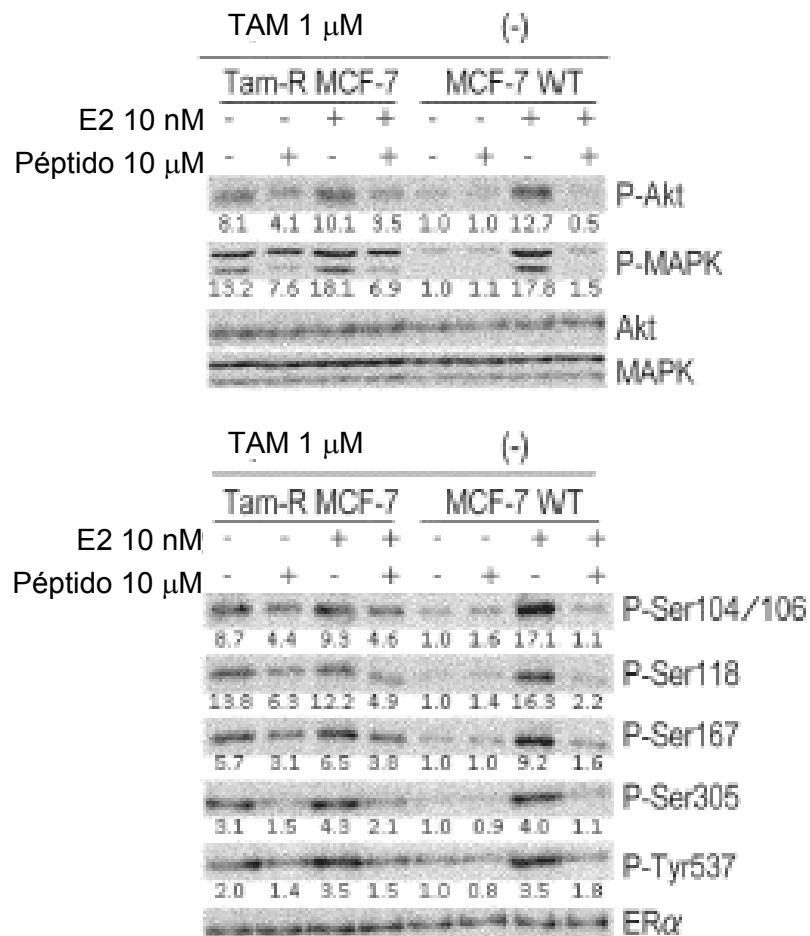
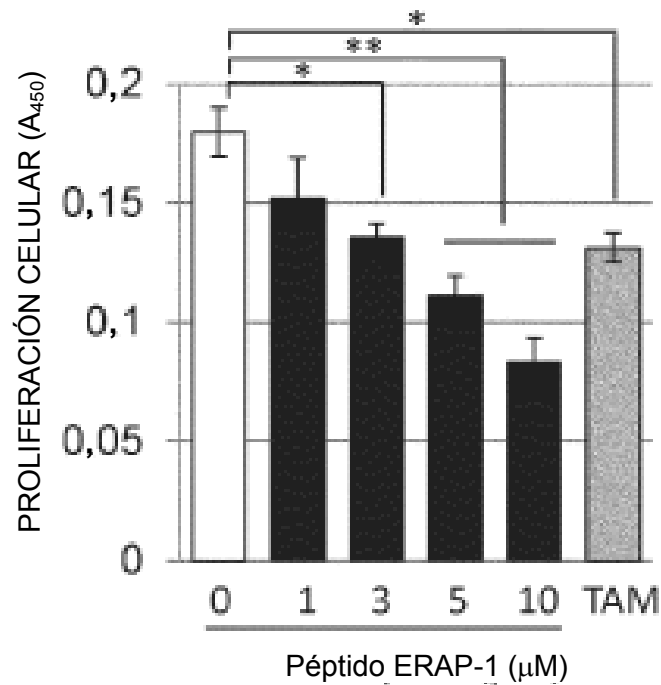


FIG. 15

A CÉLULAS MCF-7



B

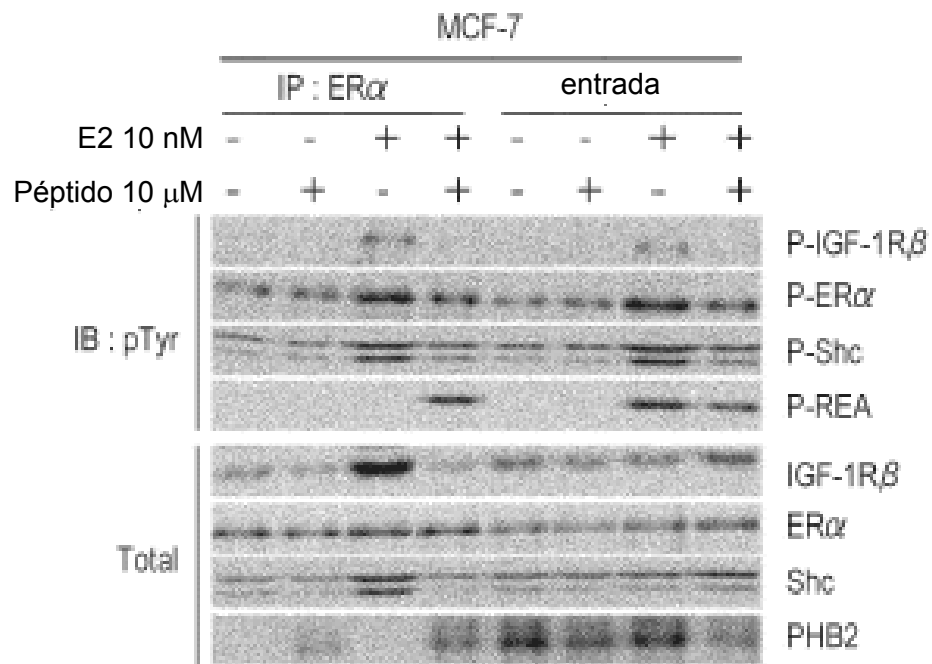
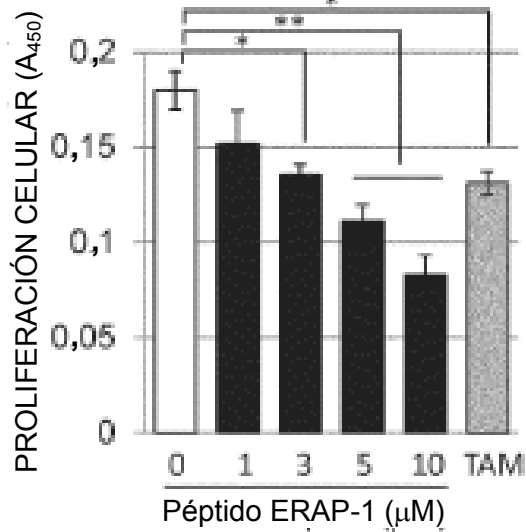
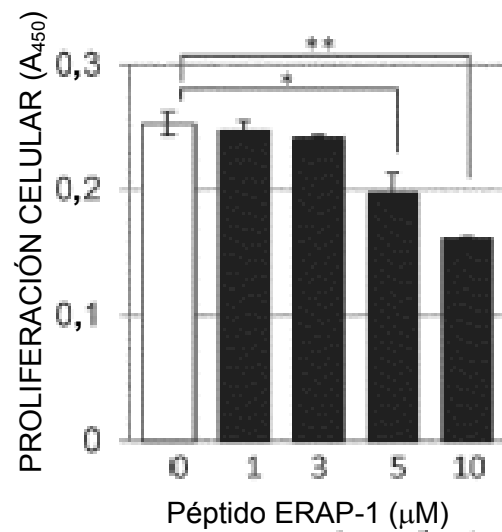


FIG. 16

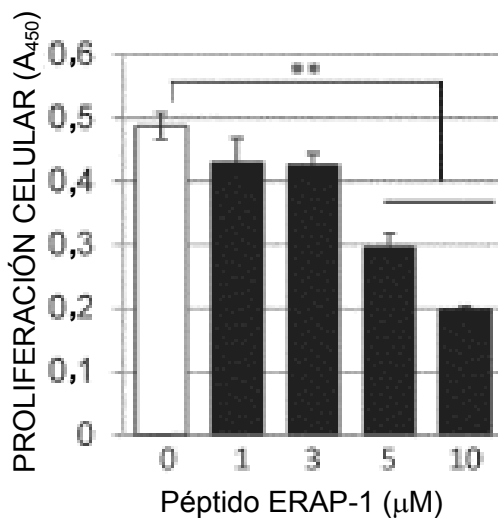
CÉLULAS MCF-7 (24 h)



CÉLULAS KPL-3C (48 h)



CÉLULAS ZR-75-1 (96 h)



CÉLULAS 747D (96 h)

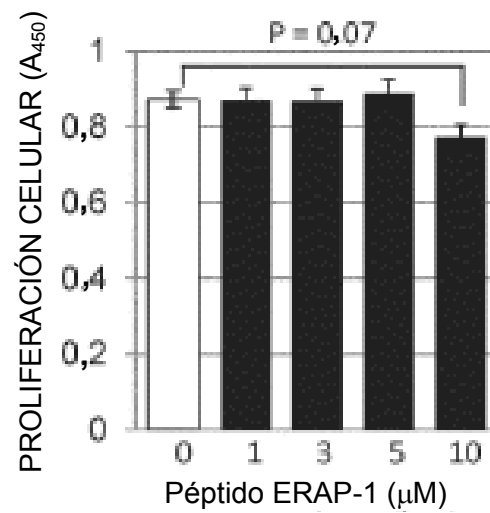


FIG. 17

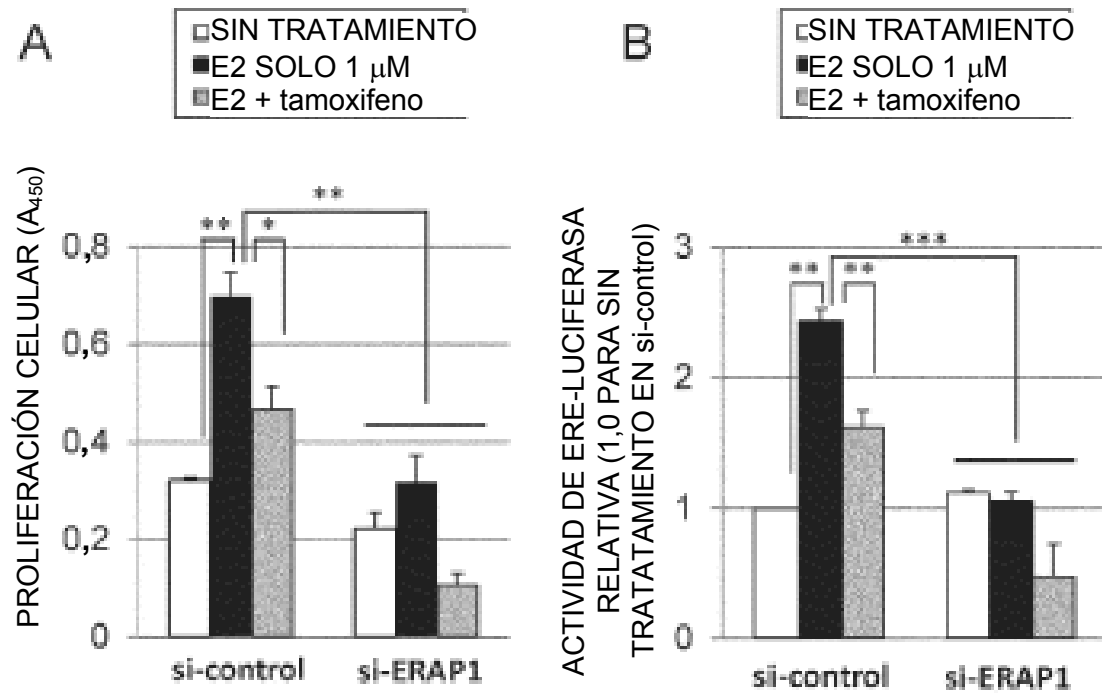


FIG. 18

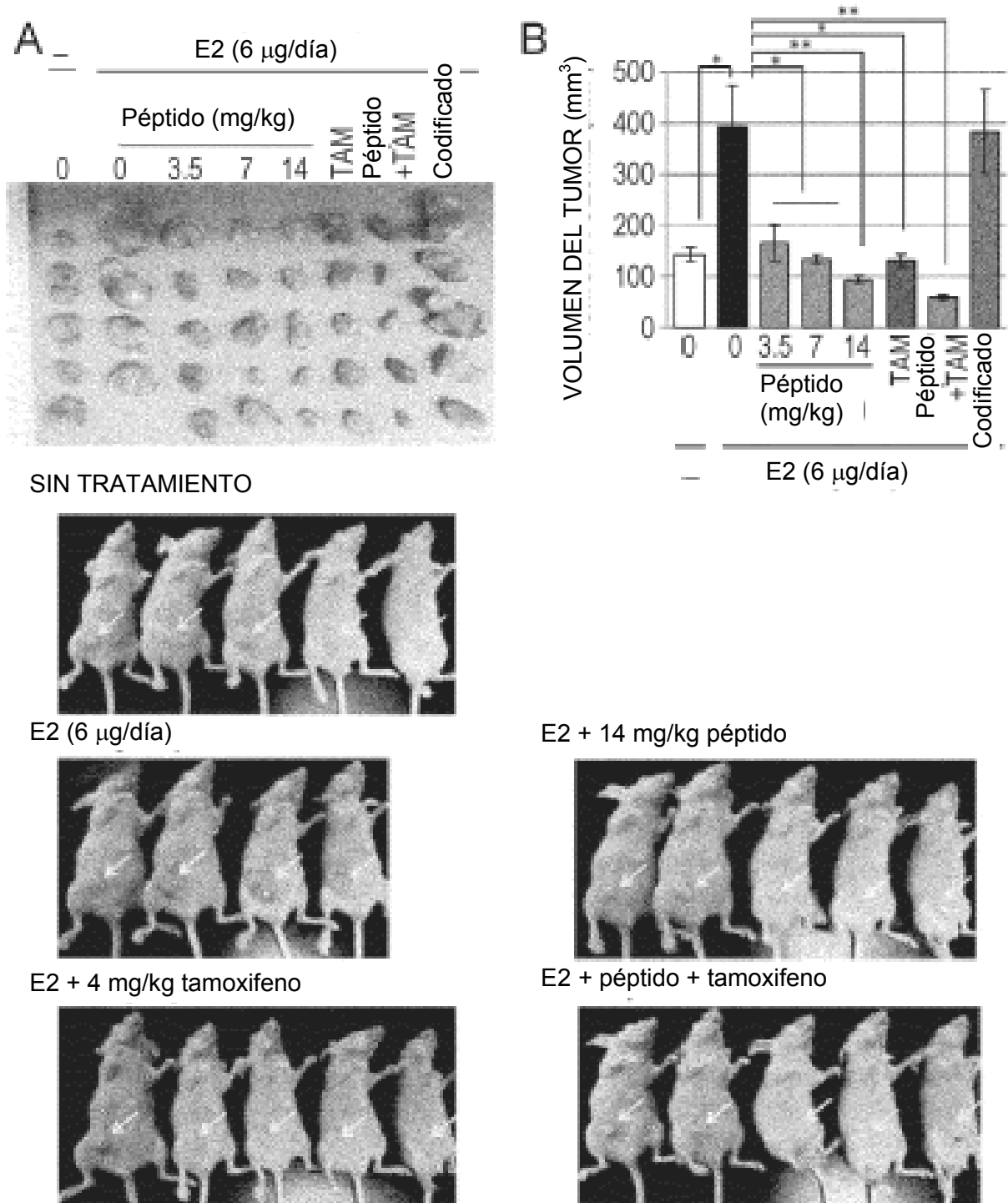


FIG. 19

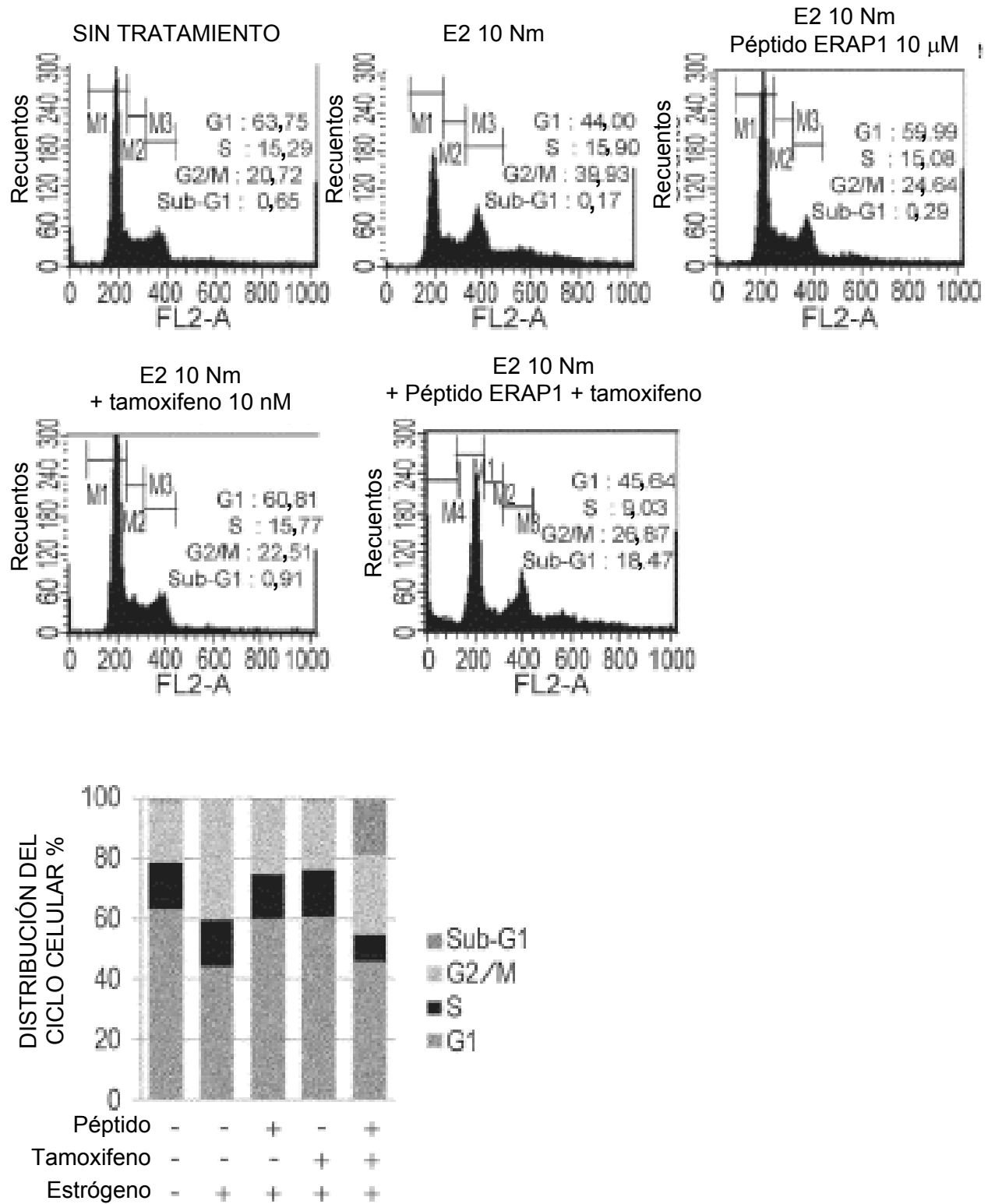


FIG. 20

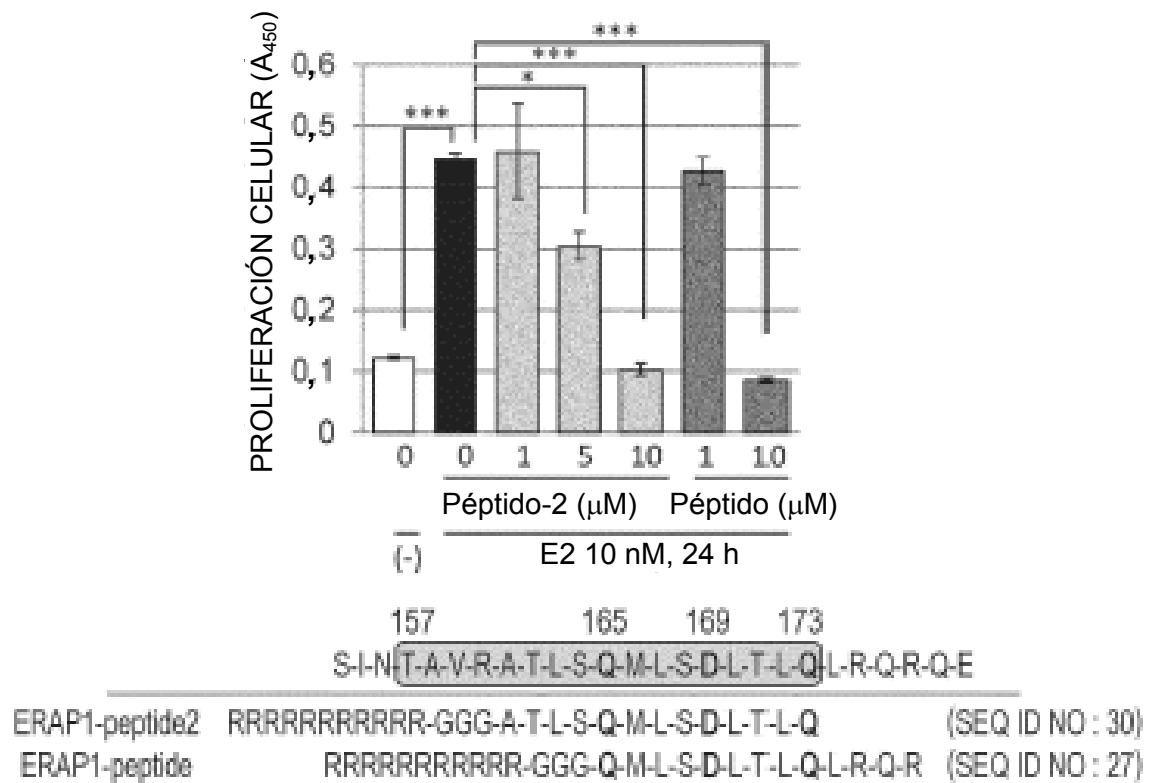
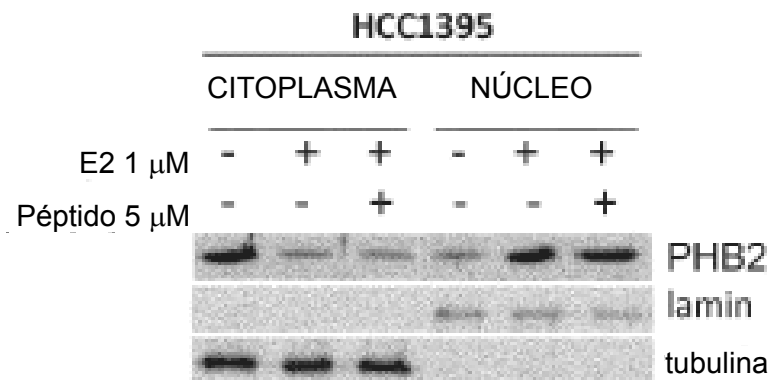
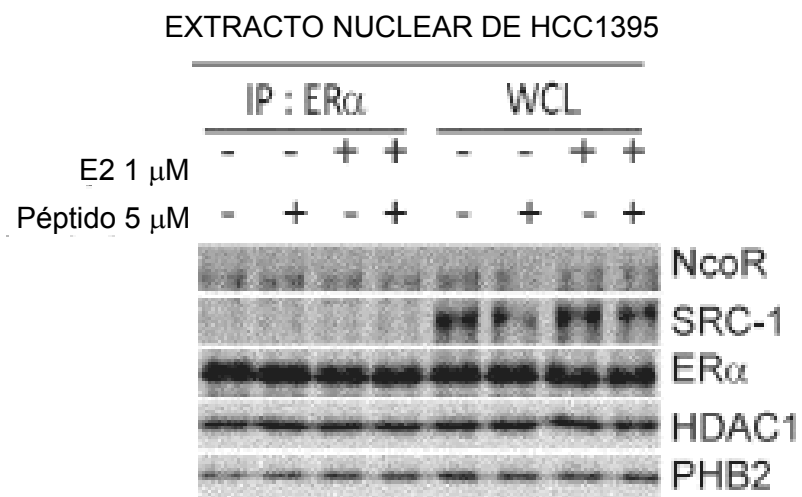


FIG. 21

A



B



C

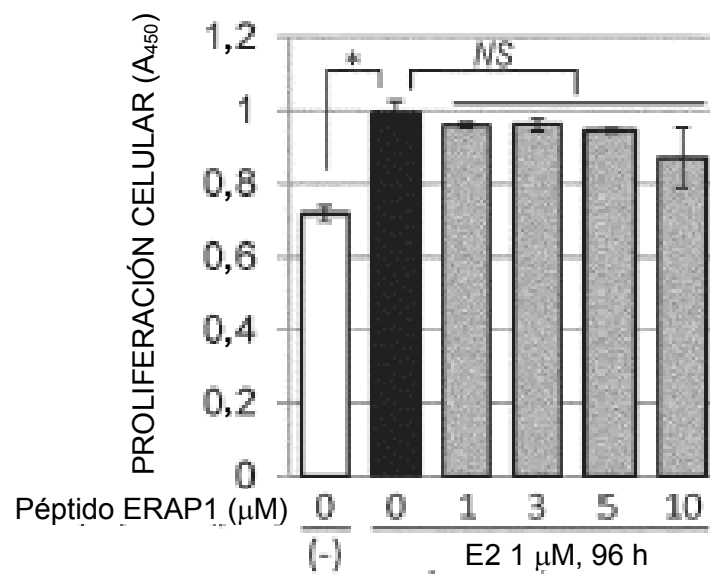


FIG. 22

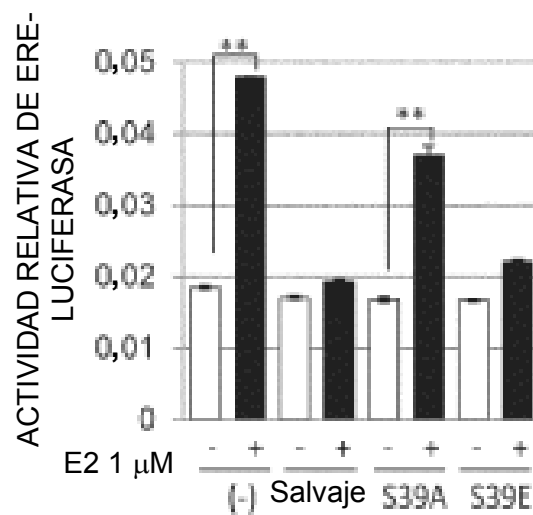
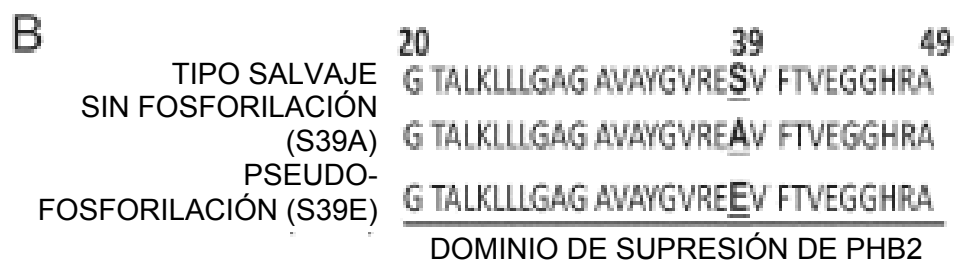
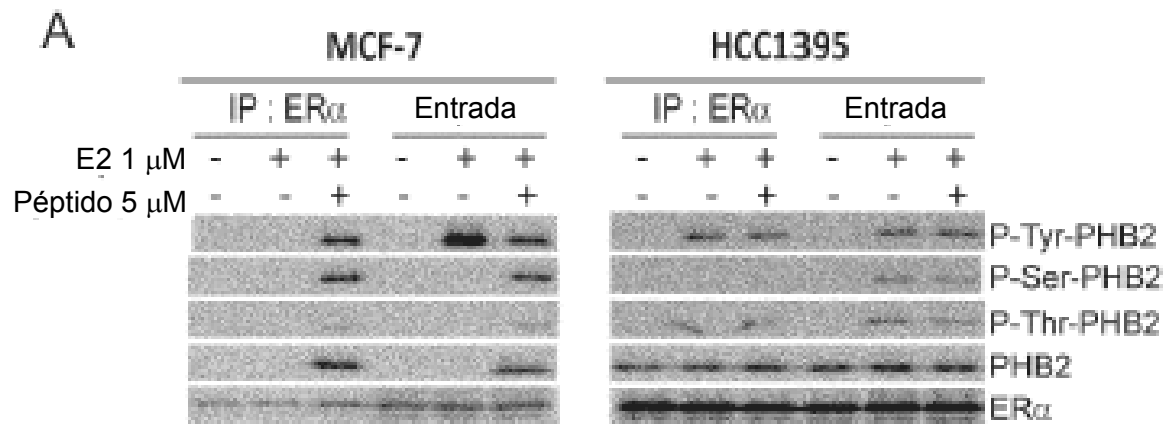


FIG. 23

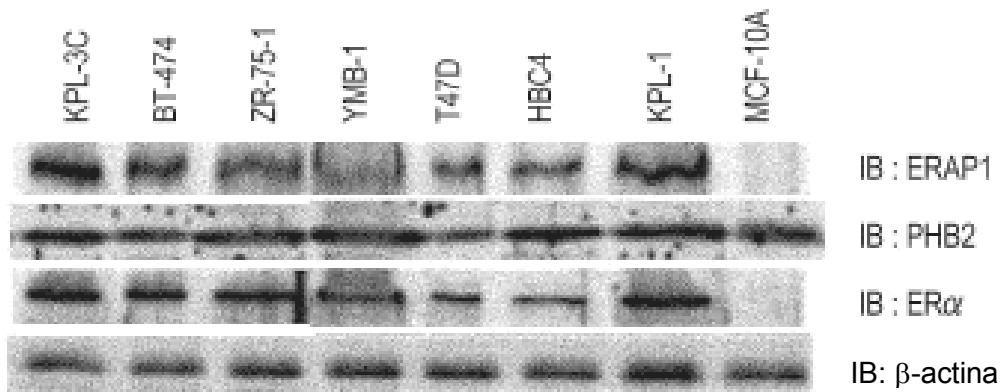


FIG. 24

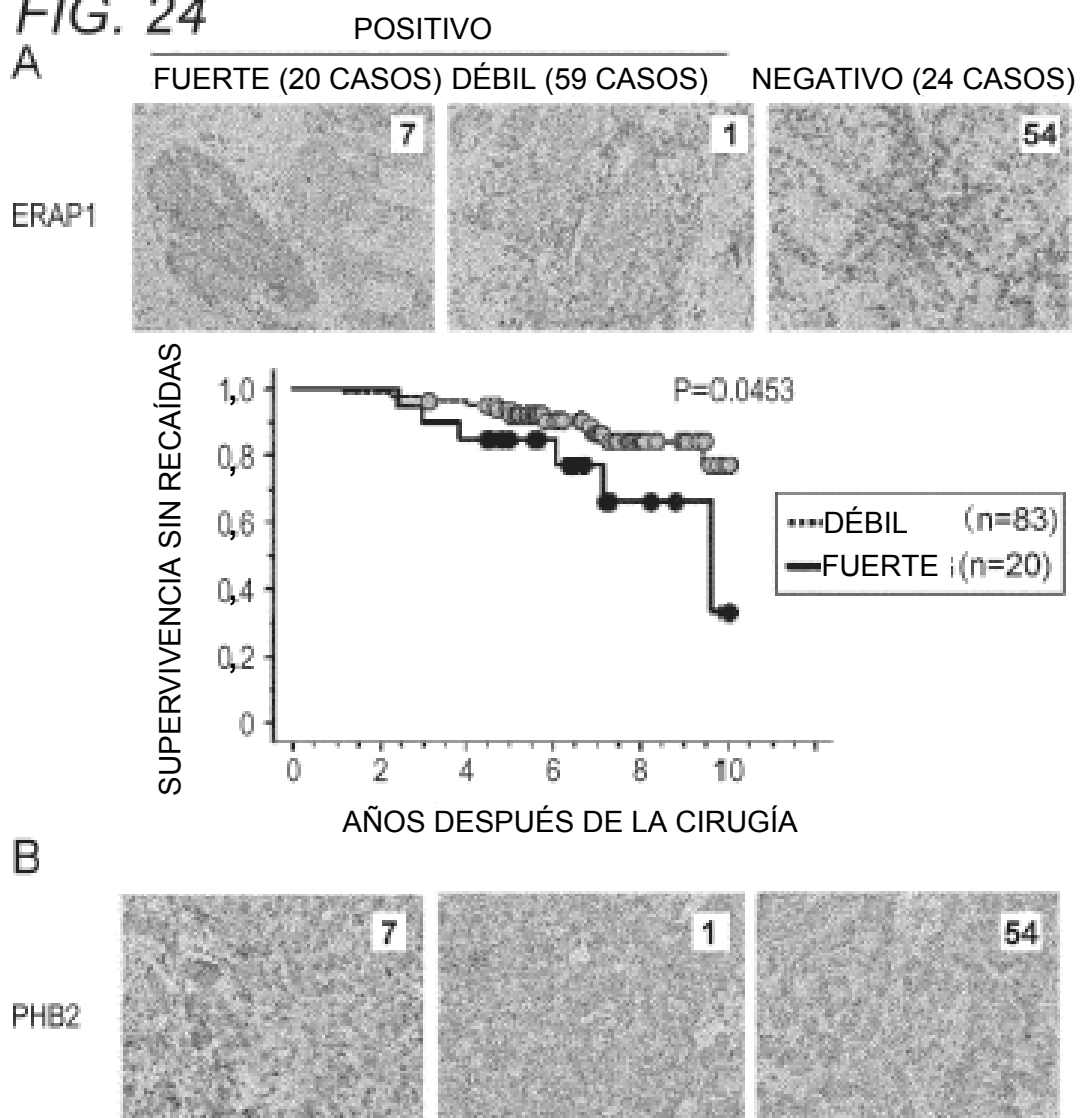
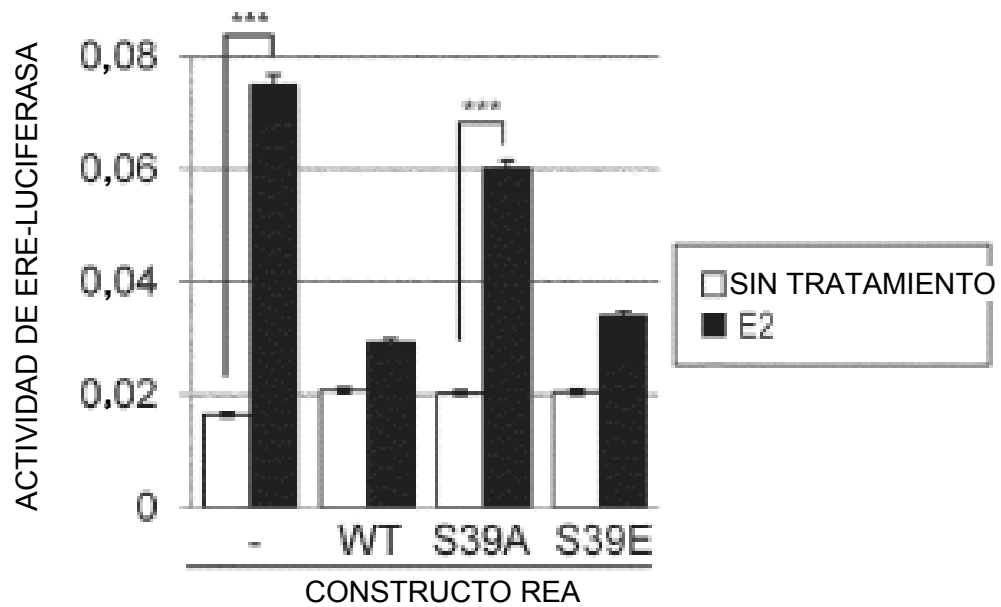


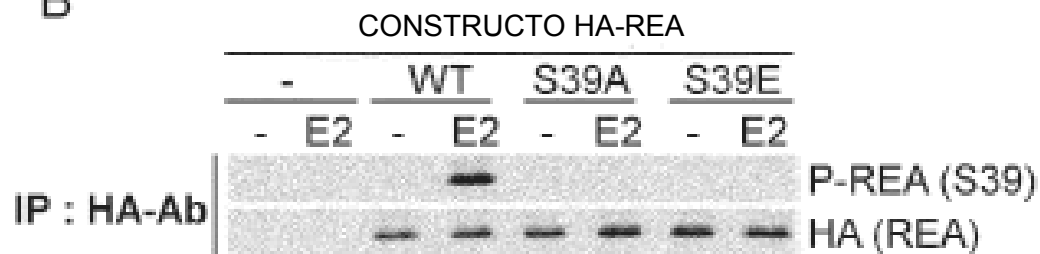
FIG. 25

A

CÉLULAS HEK293T



B



C

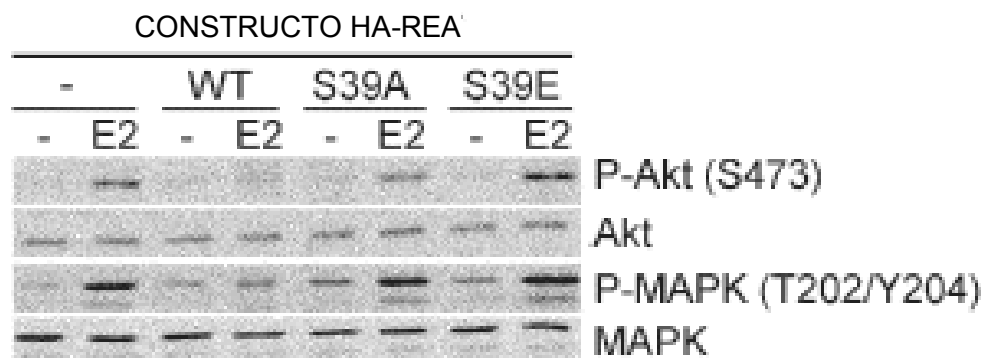


FIG. 26-1

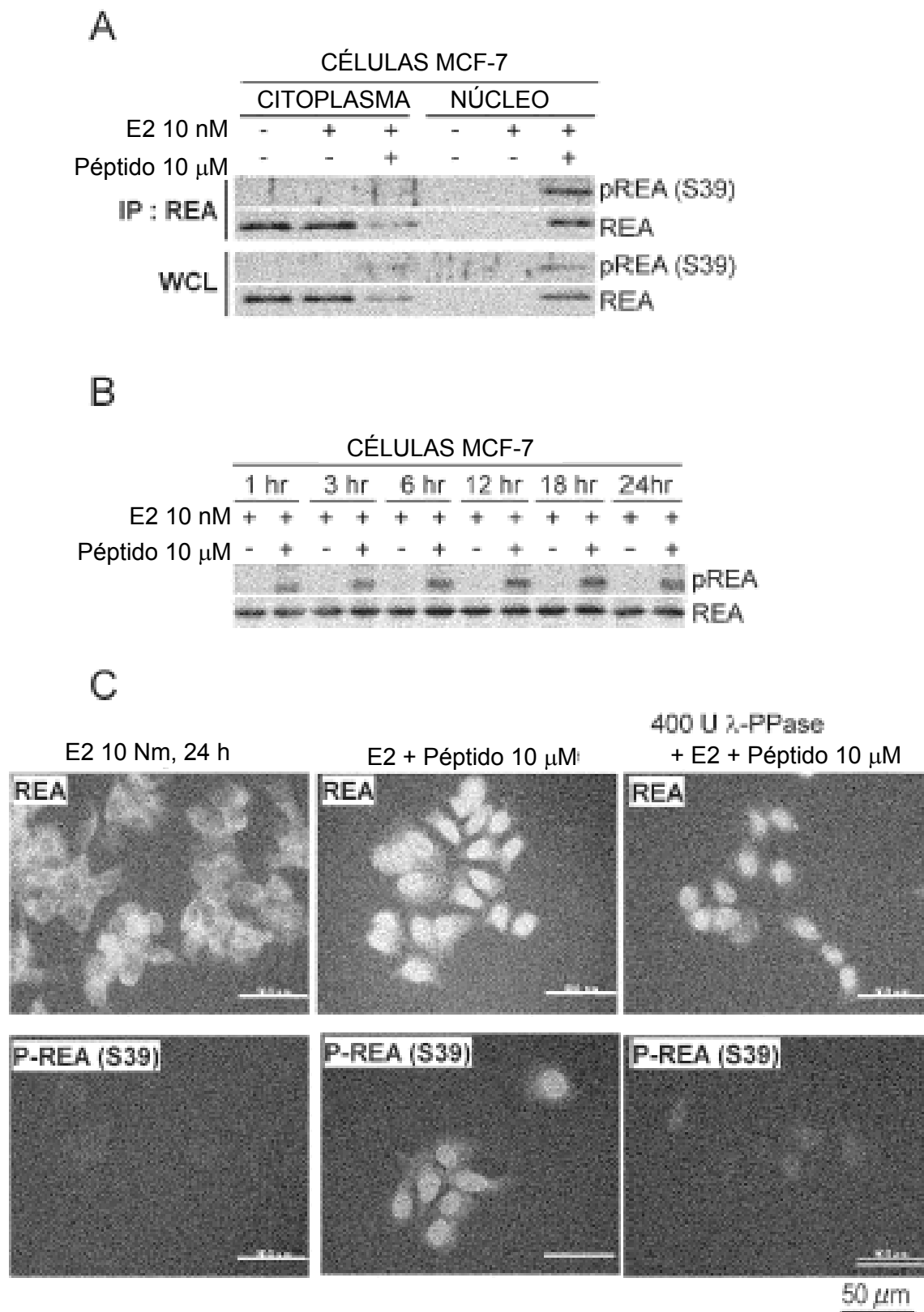
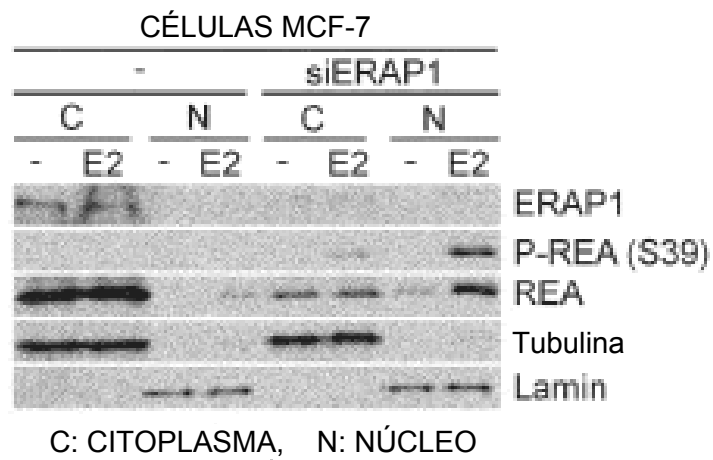


FIG. 26-2

D



E

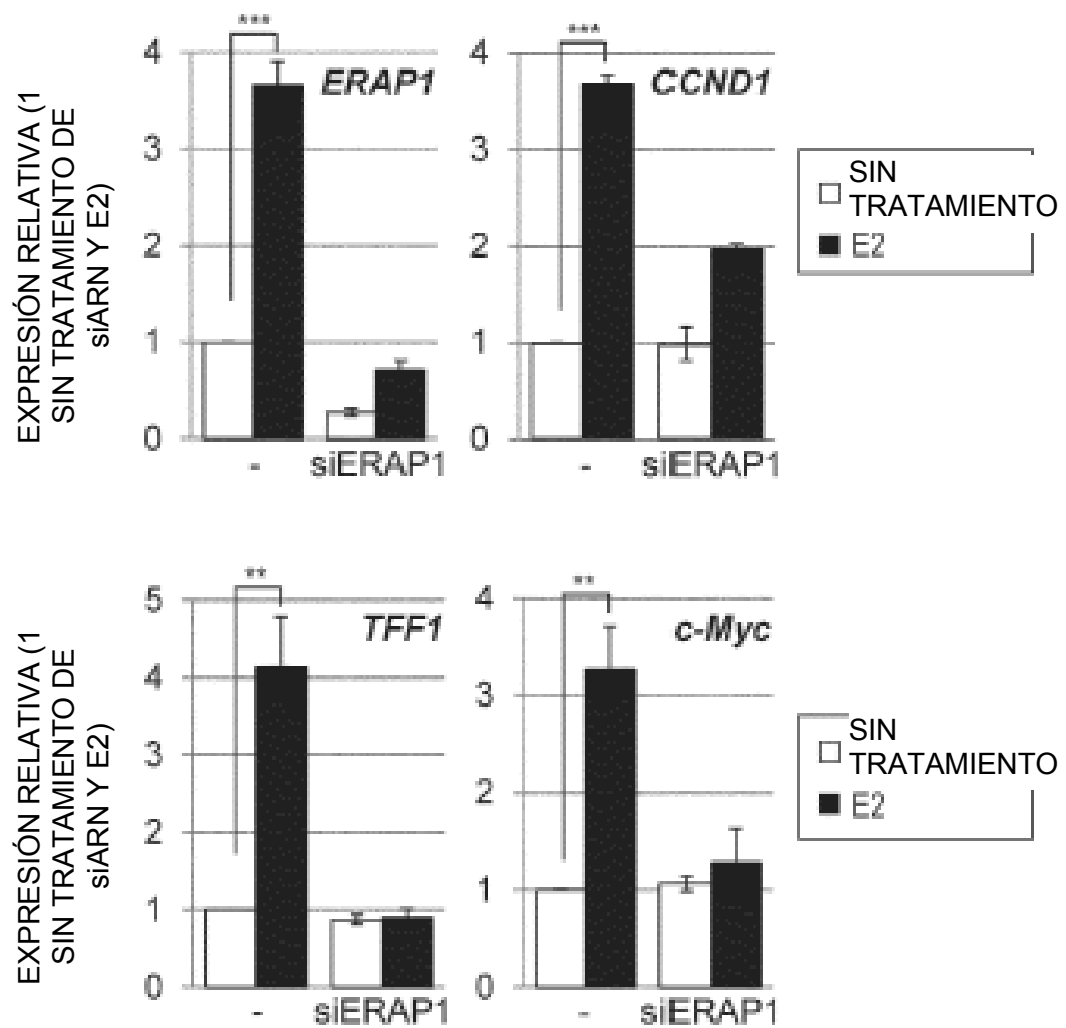


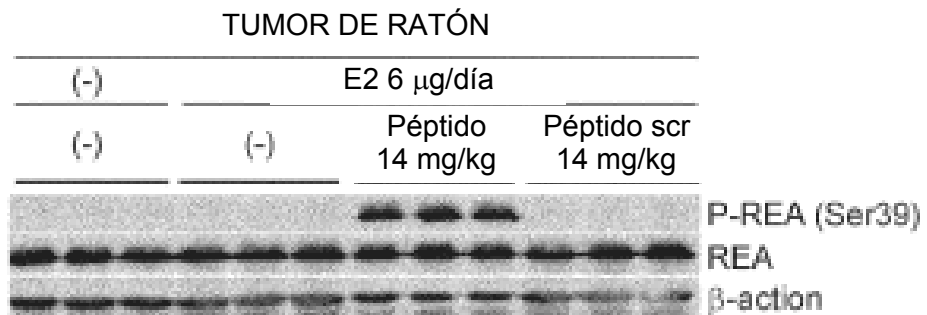
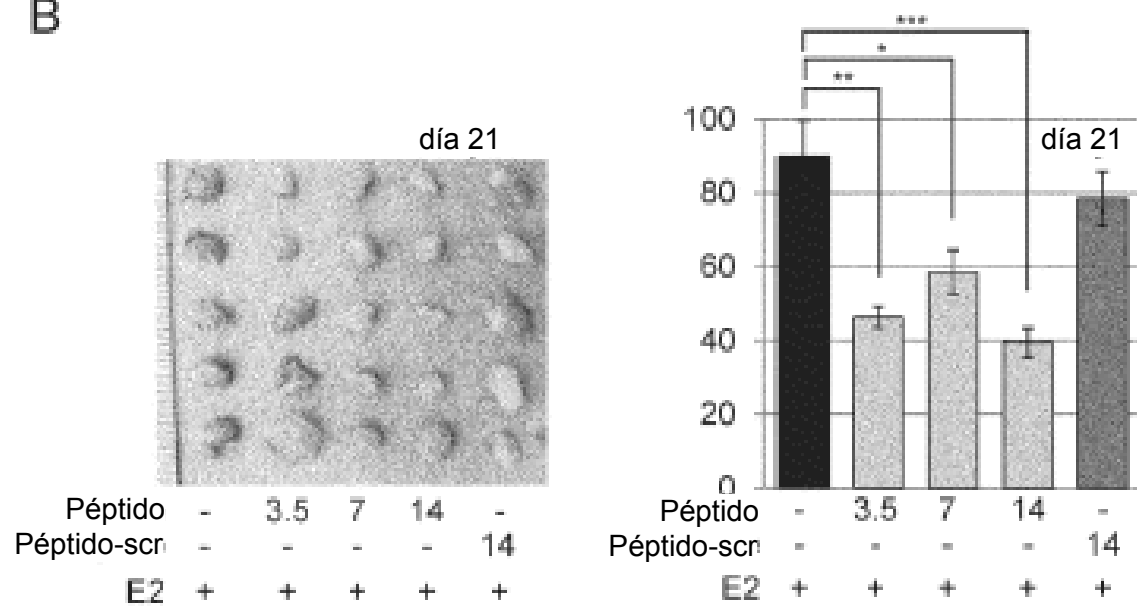
FIG. 27**A****B**

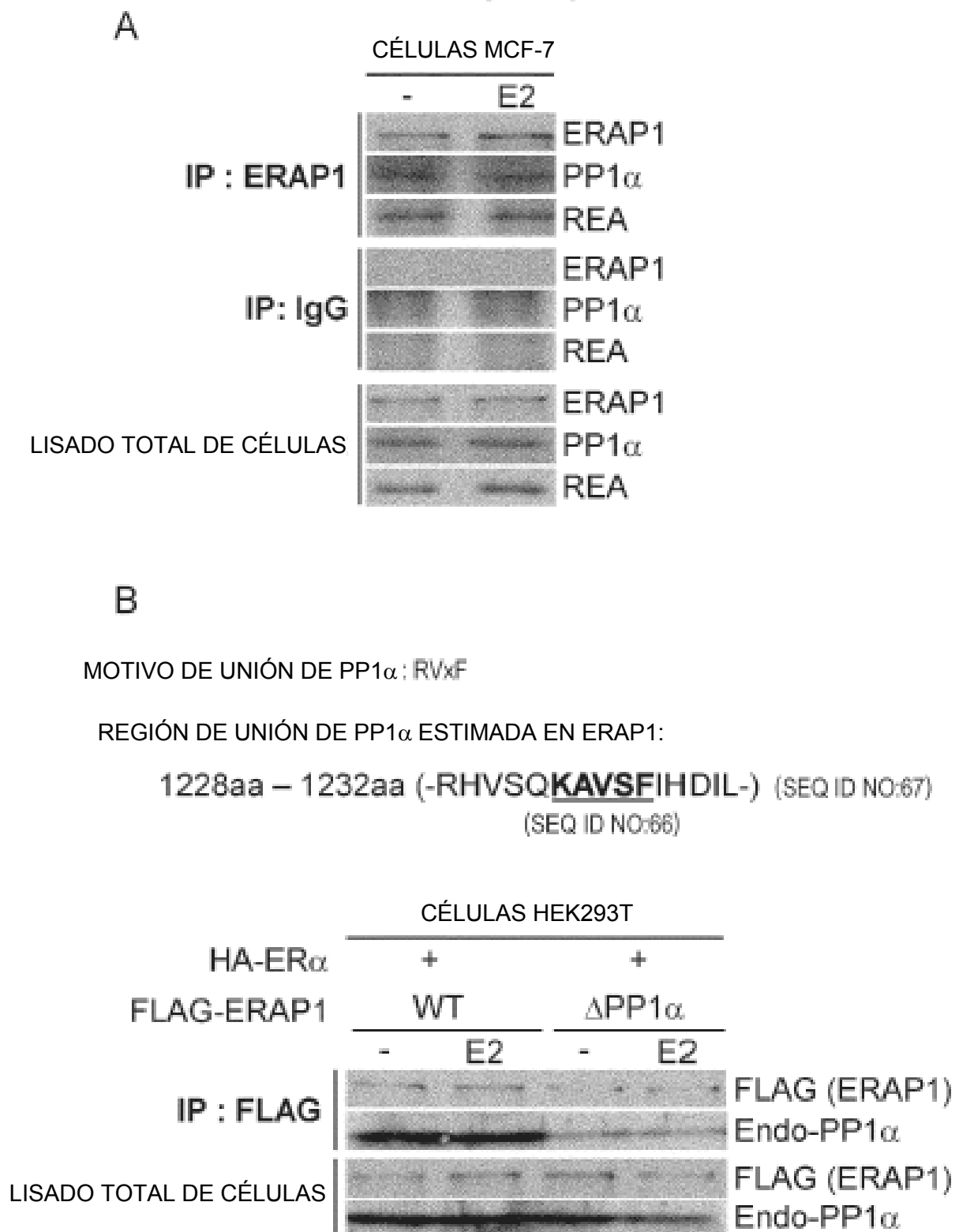
FIG. 28-1

FIG. 28-2

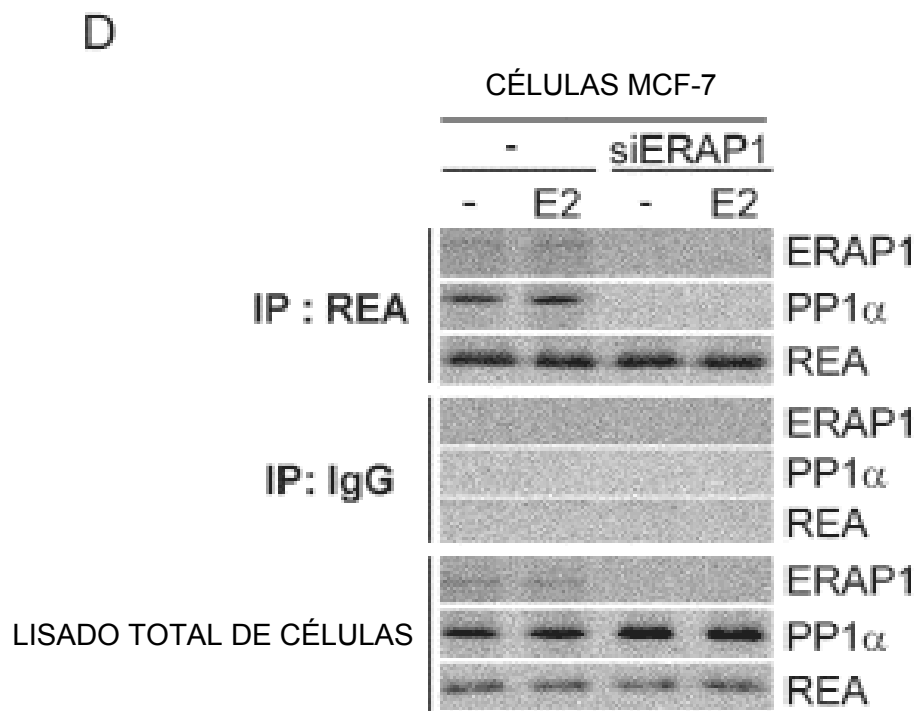
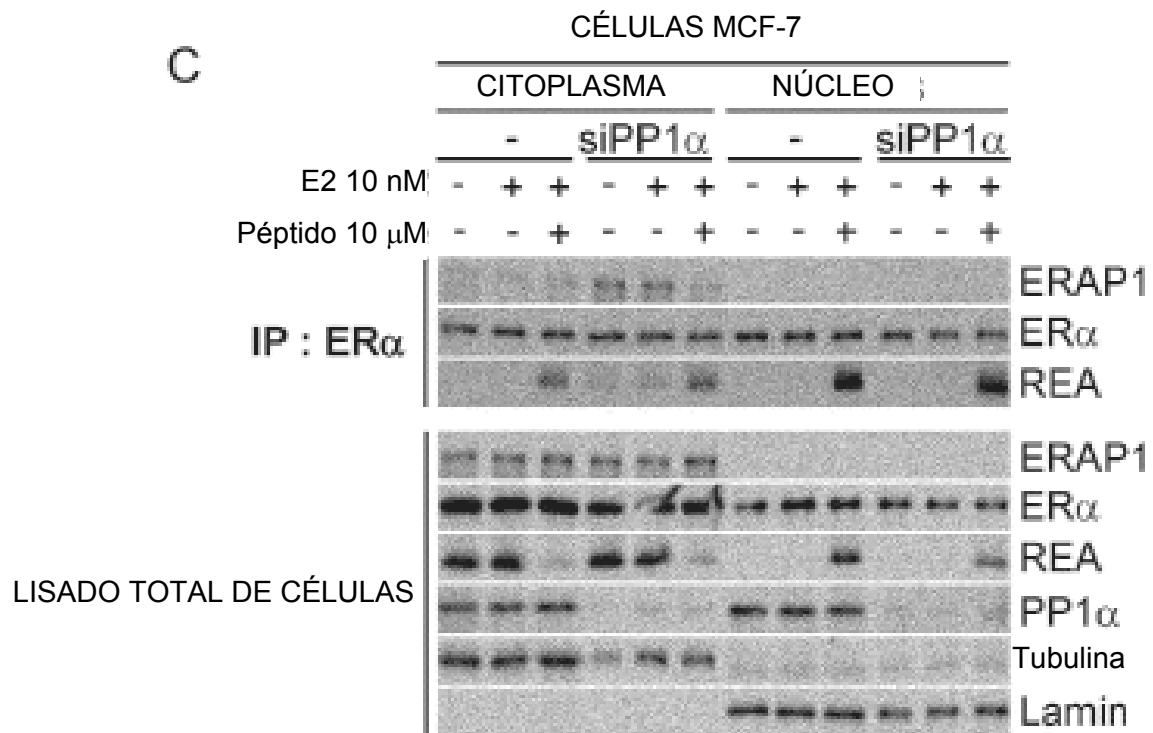


FIG. 29
CÉLULAS MCF-7

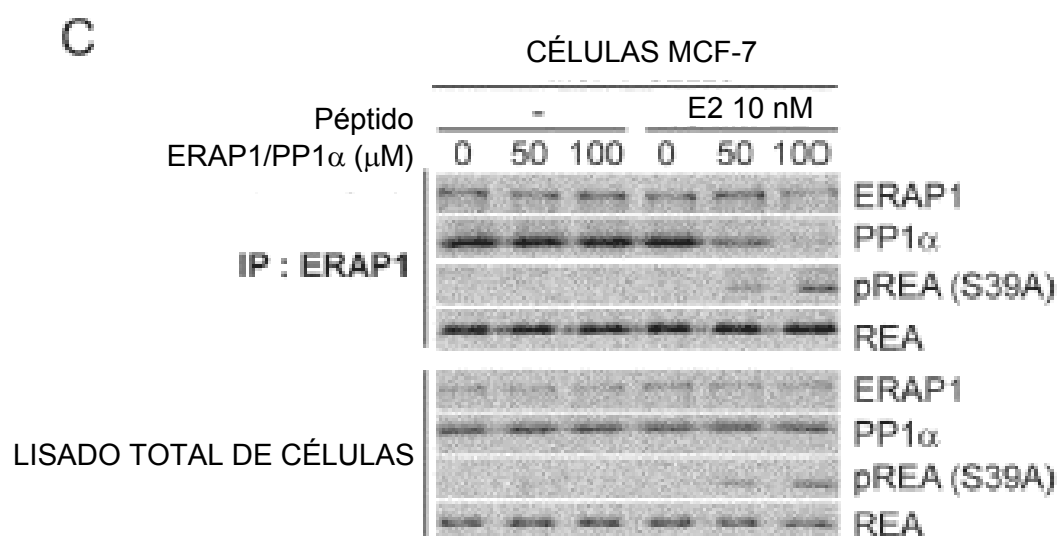
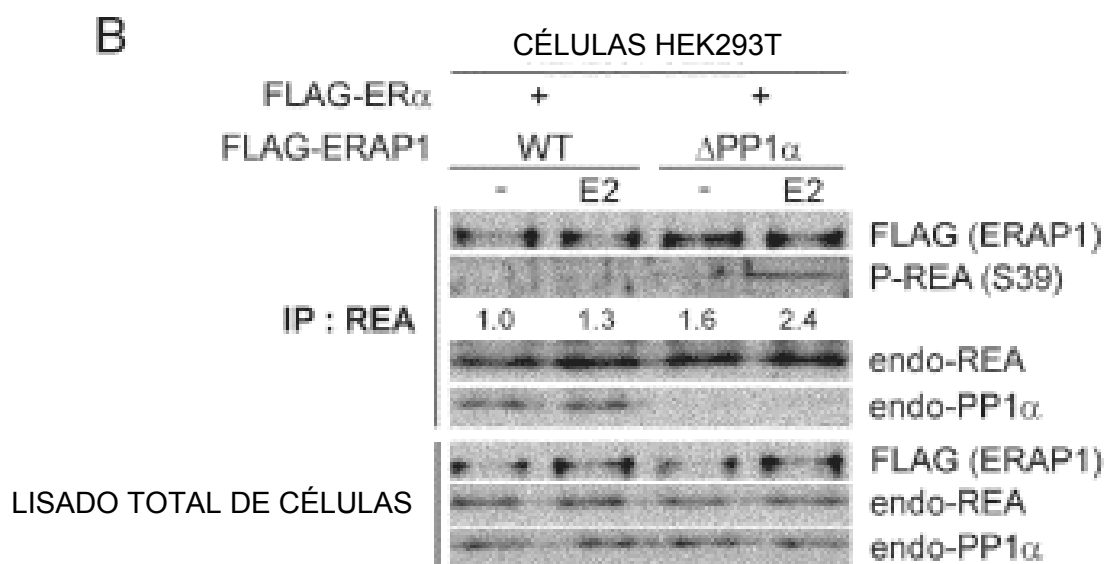
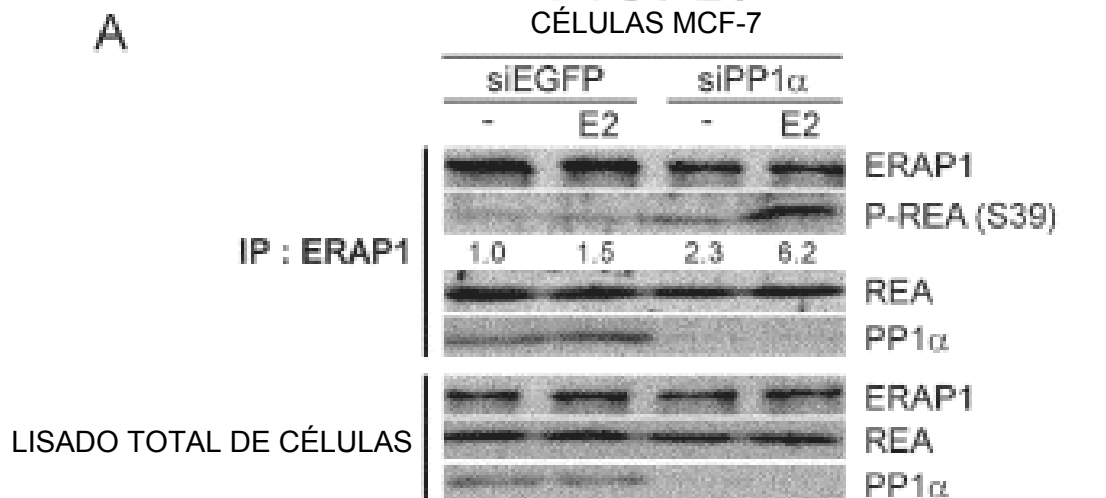
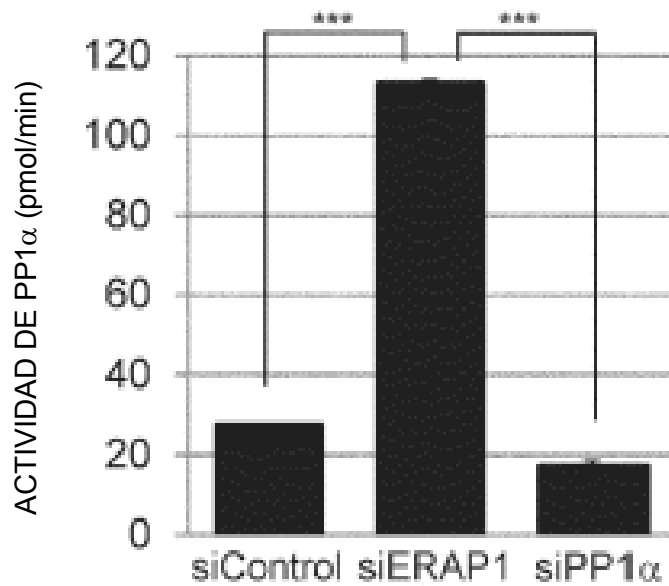


FIG. 30-1

A

CÉLULAS MCF-7



B

CÉLULAS HEK293T

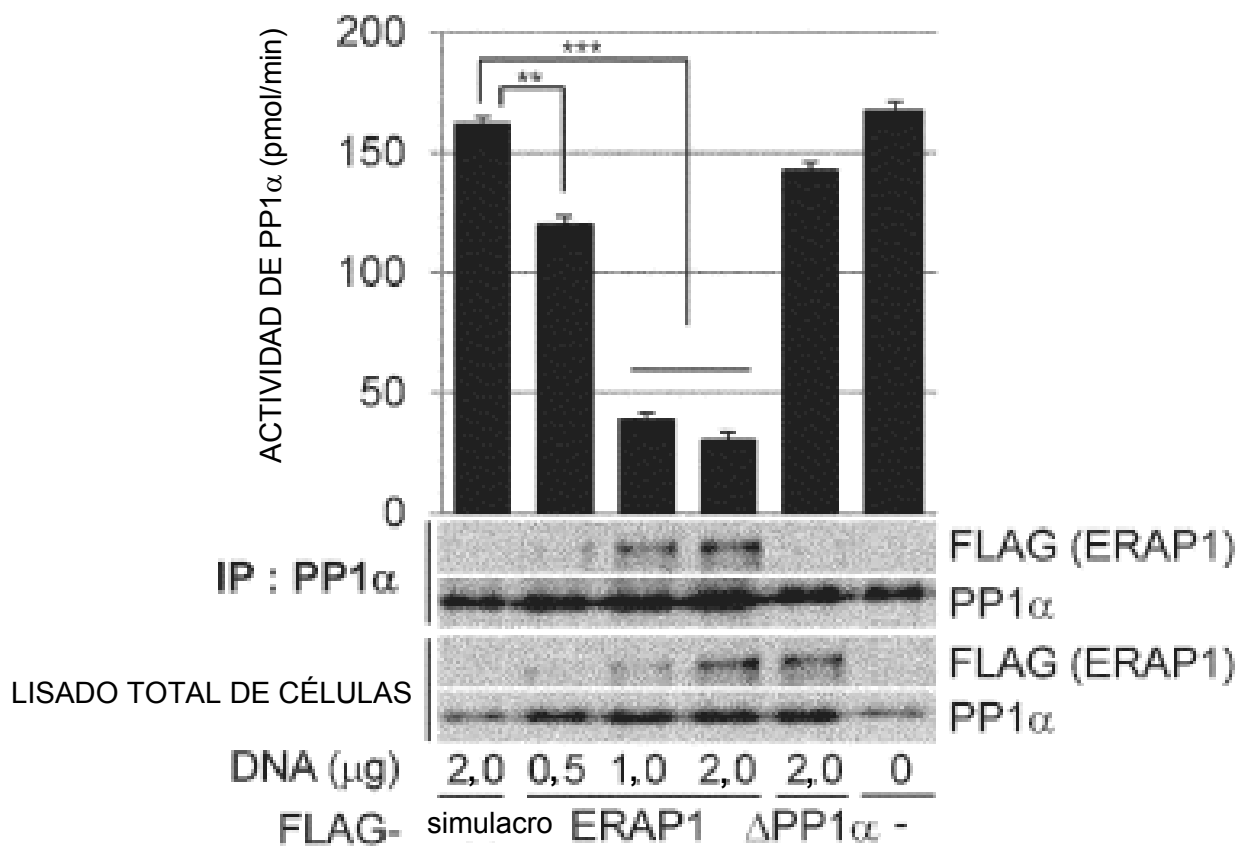
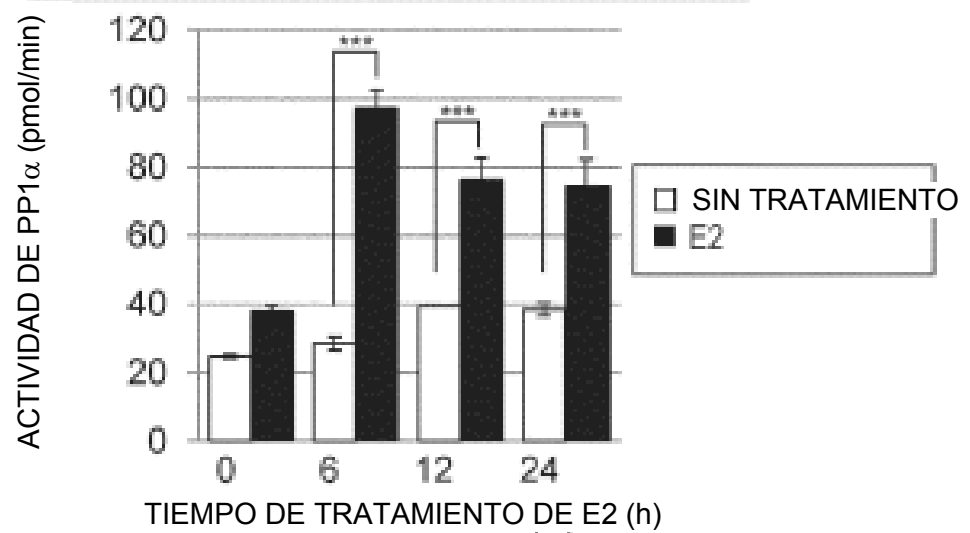


FIG. 30-2

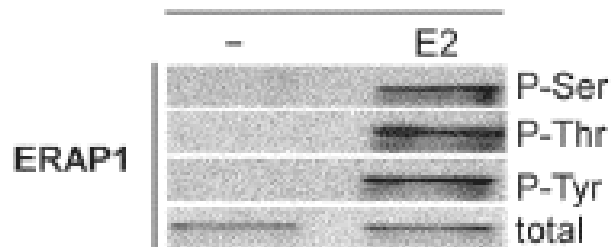
C

CÉLULAS MCF-7



D

CÉLULAS MCF-7



E

CÉLULAS MCF-7

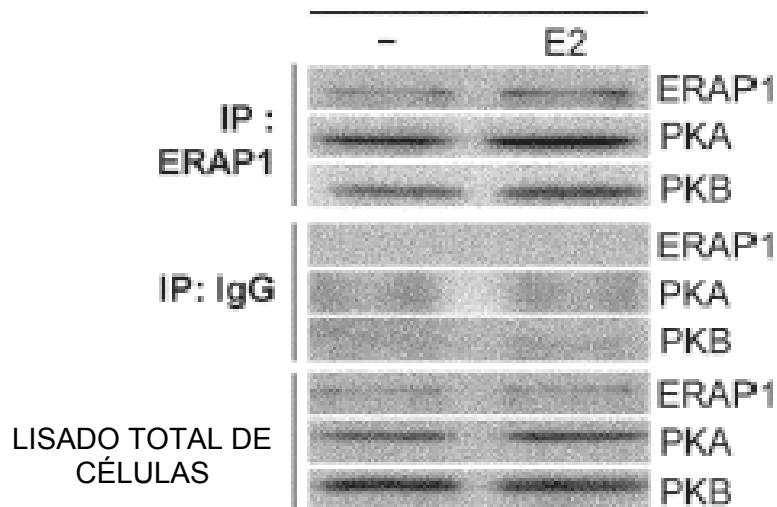
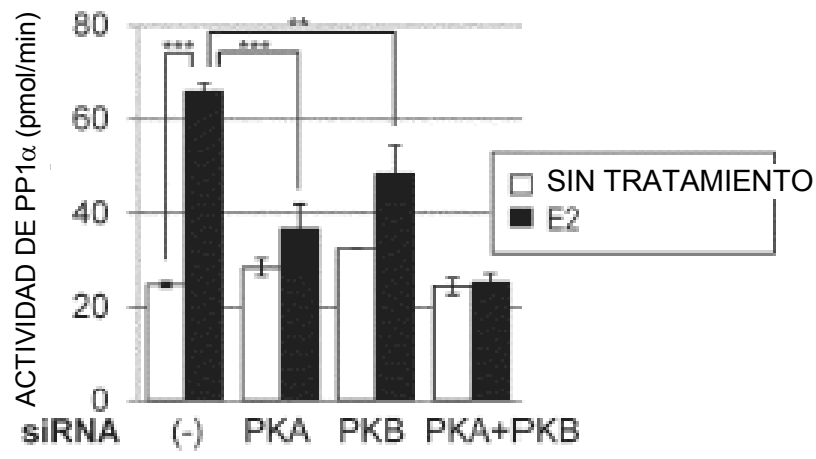
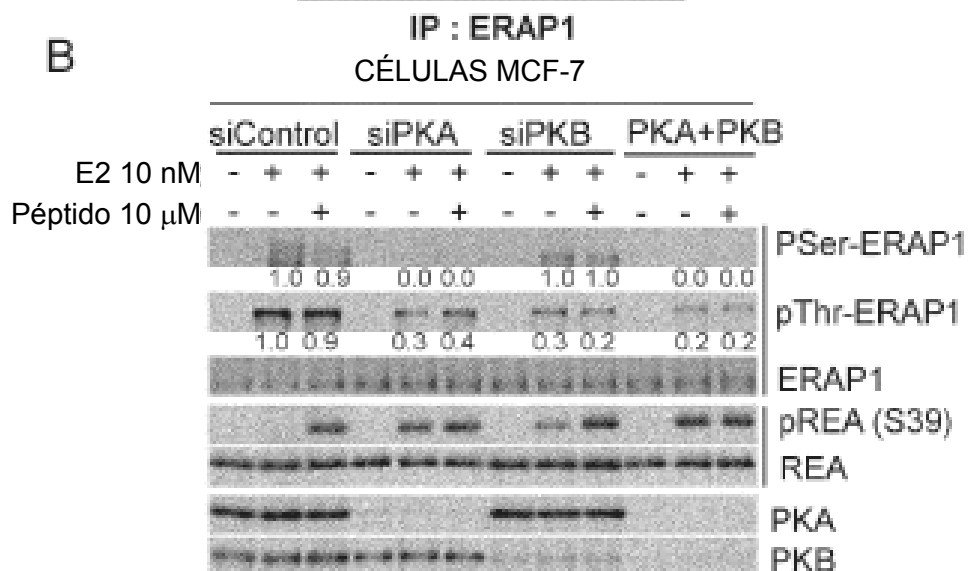


FIG. 31-1
CÉLULAS MCF-7

A



B



C

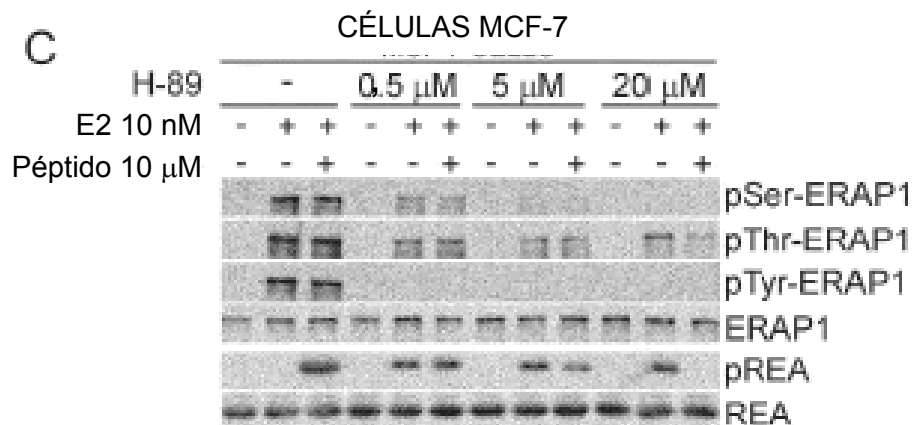
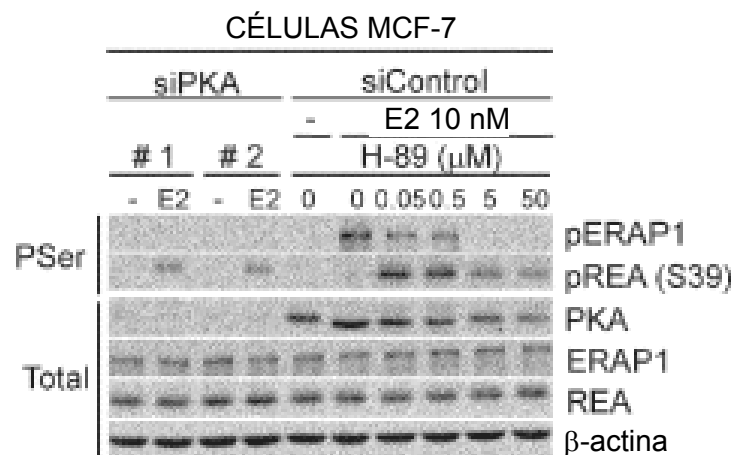
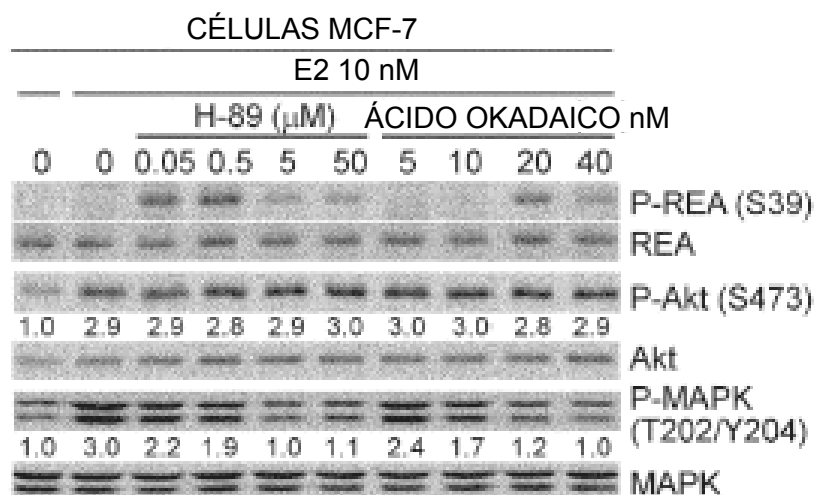


FIG. 31-2

D



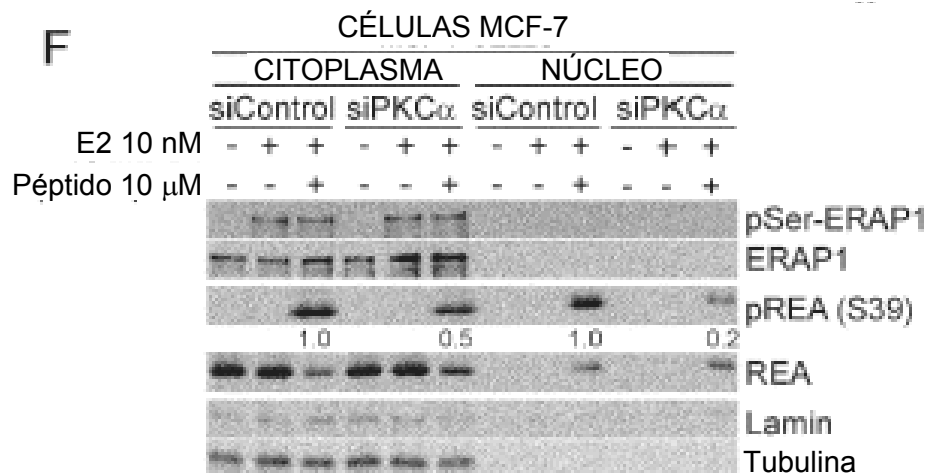
E

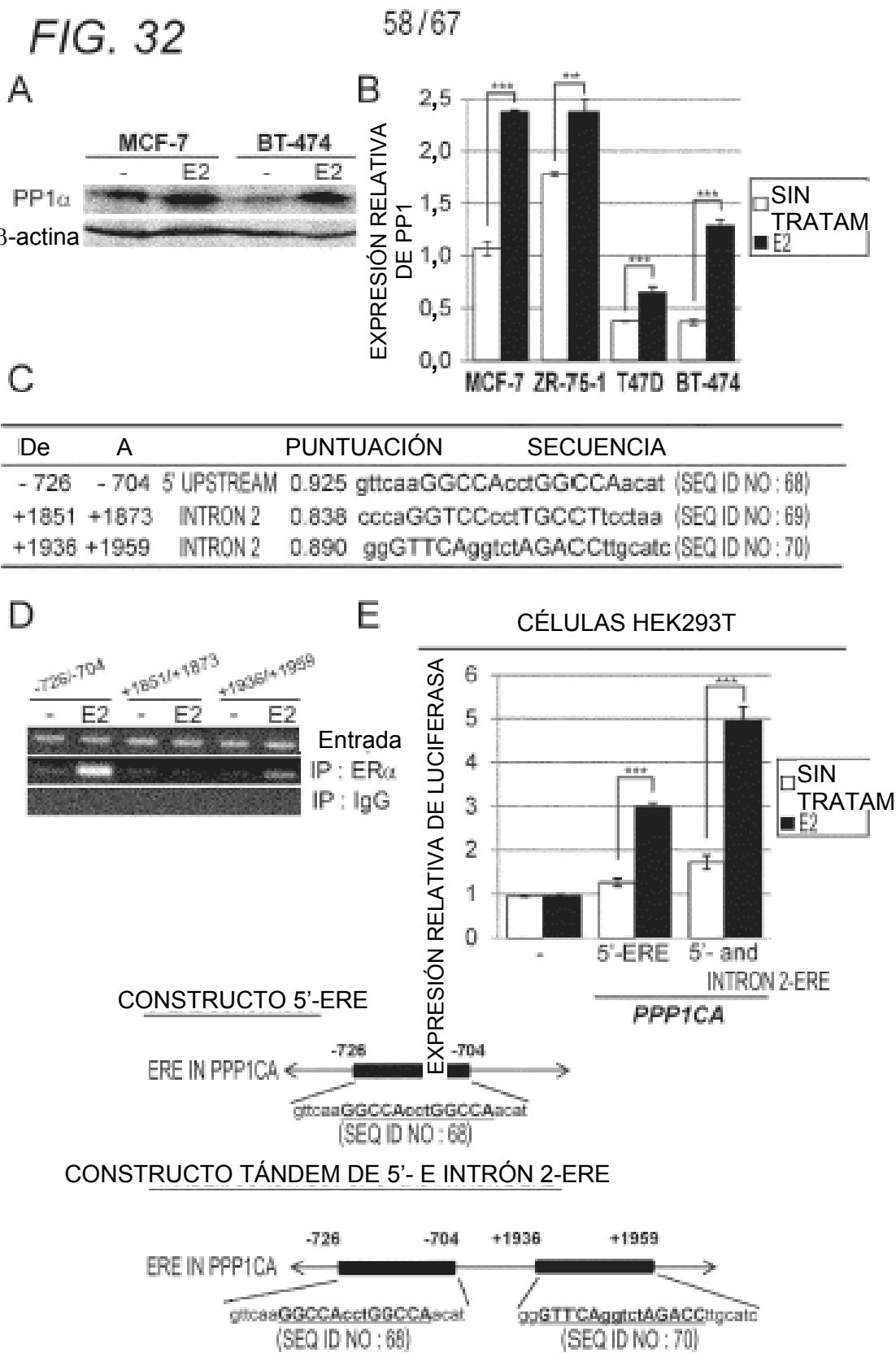


H-89; INHIBIDOR DE PKA ESPECÍFICO: IC₅₀ = 10 μM

INHIBIDOR DE ÁCIDO OKADAICO: PP1α: IC₅₀ = 20 nM

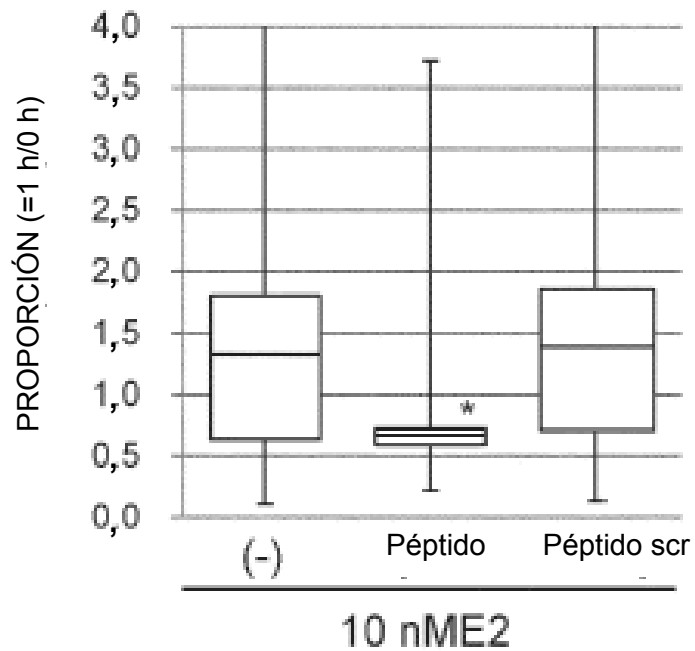
F



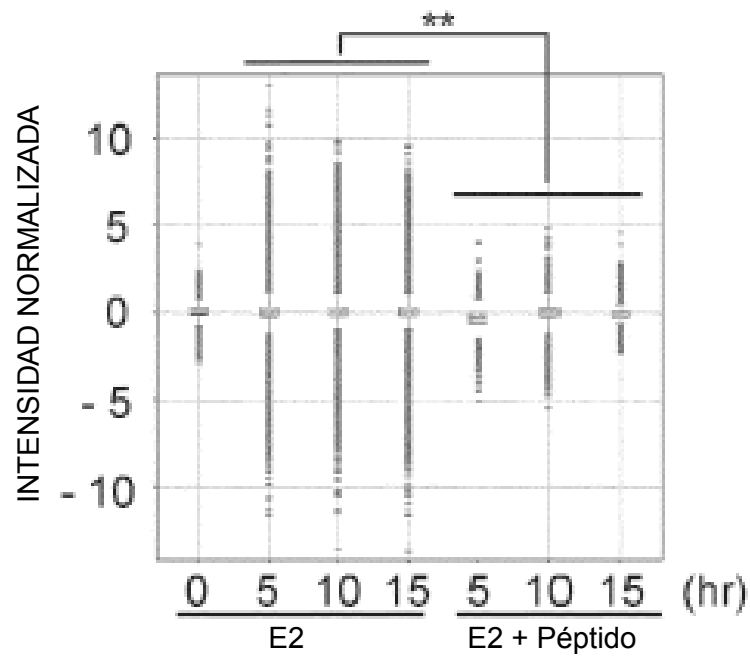


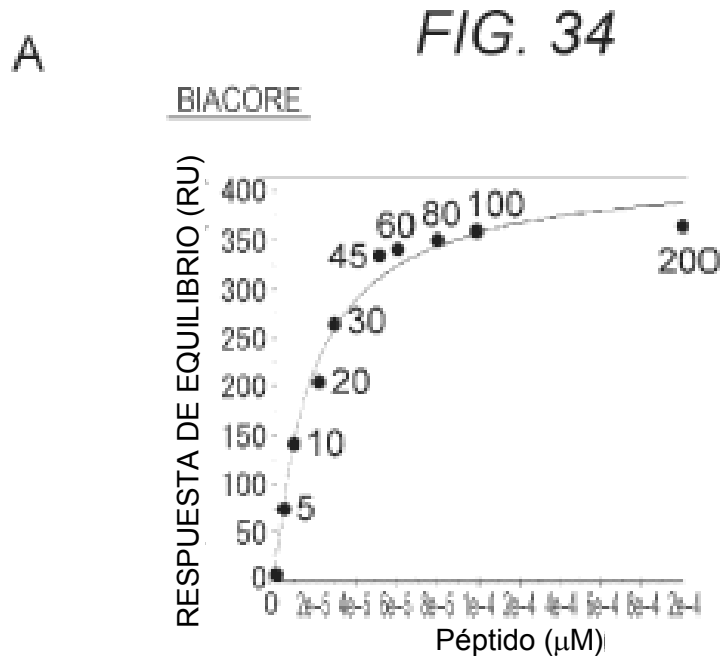
A *FIG. 33*

ANÁLISIS DE PROTEOMA



B ANÁLISIS DE TRANSCRIPTOMA

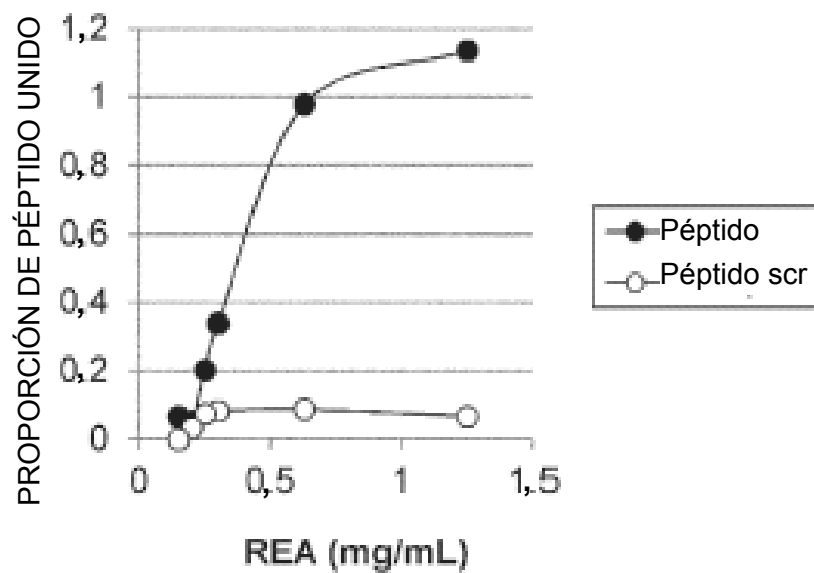




Kd de Péptido = 18,9 μM

B

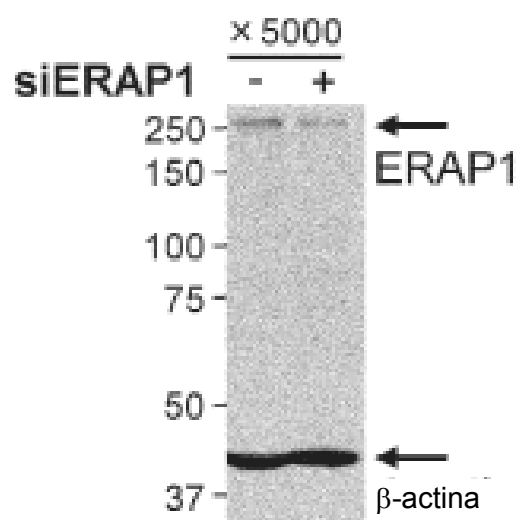
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA



Kd de REA = 0,48 mg/ml
(14,4 μM)

FIG. 35

A



B

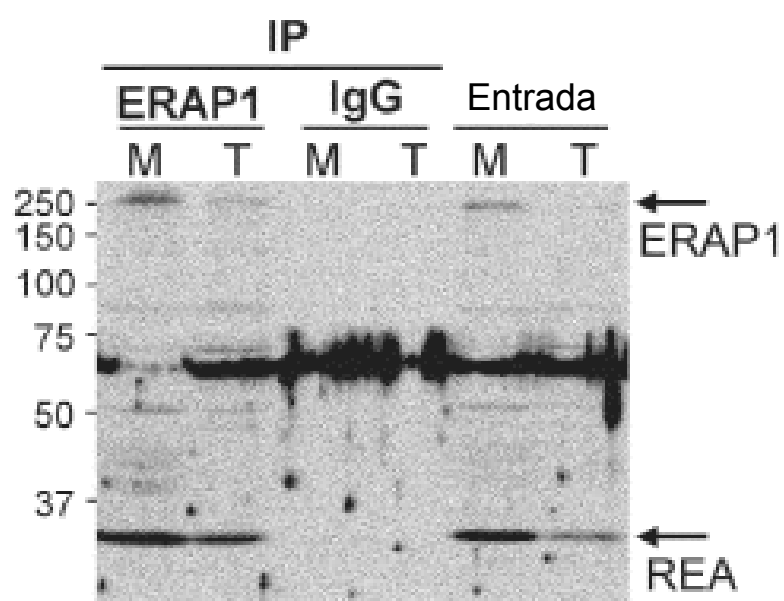


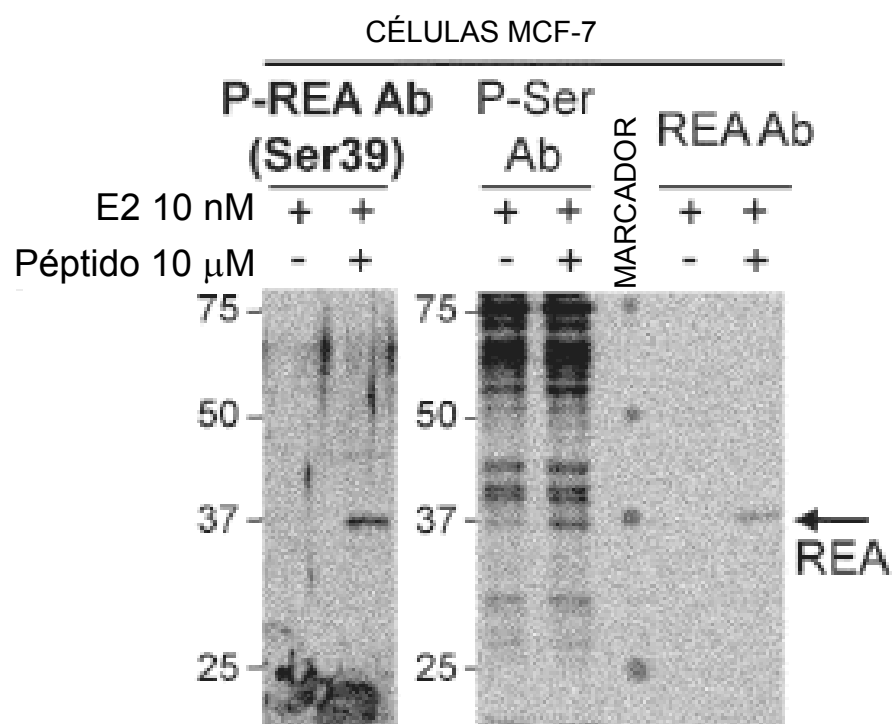
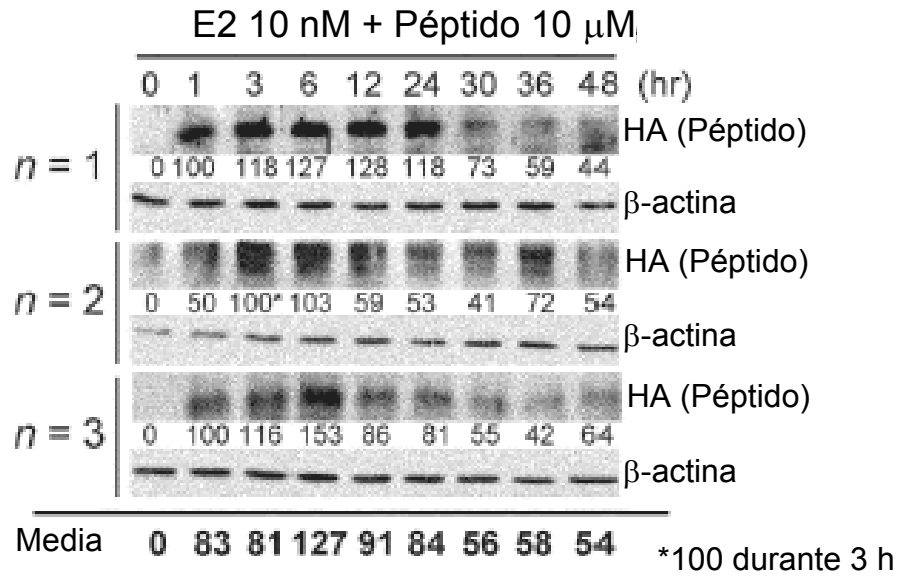
FIG. 36

FIG. 37

A



B

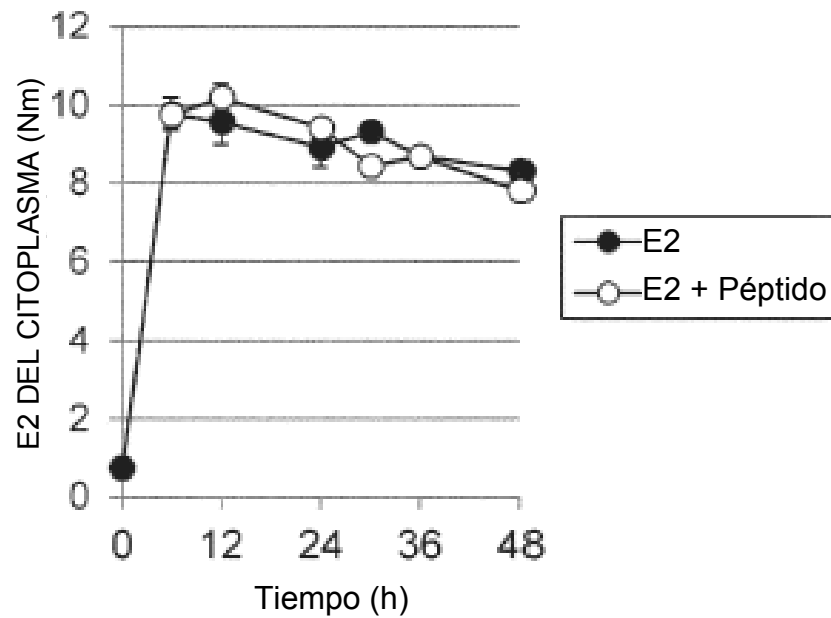


FIG. 38

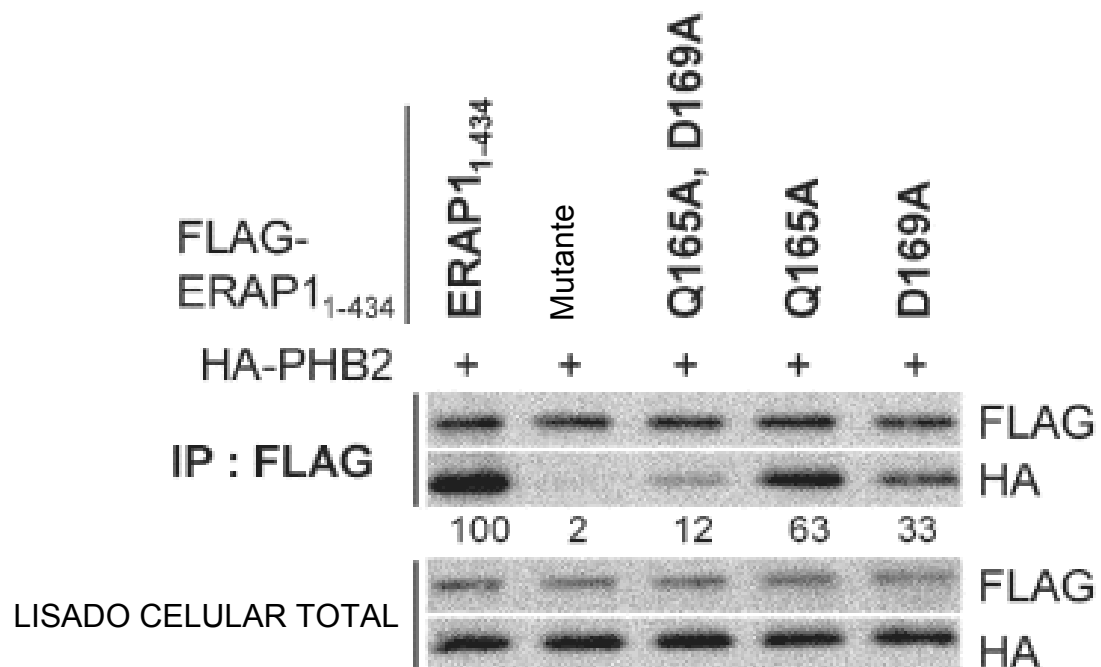
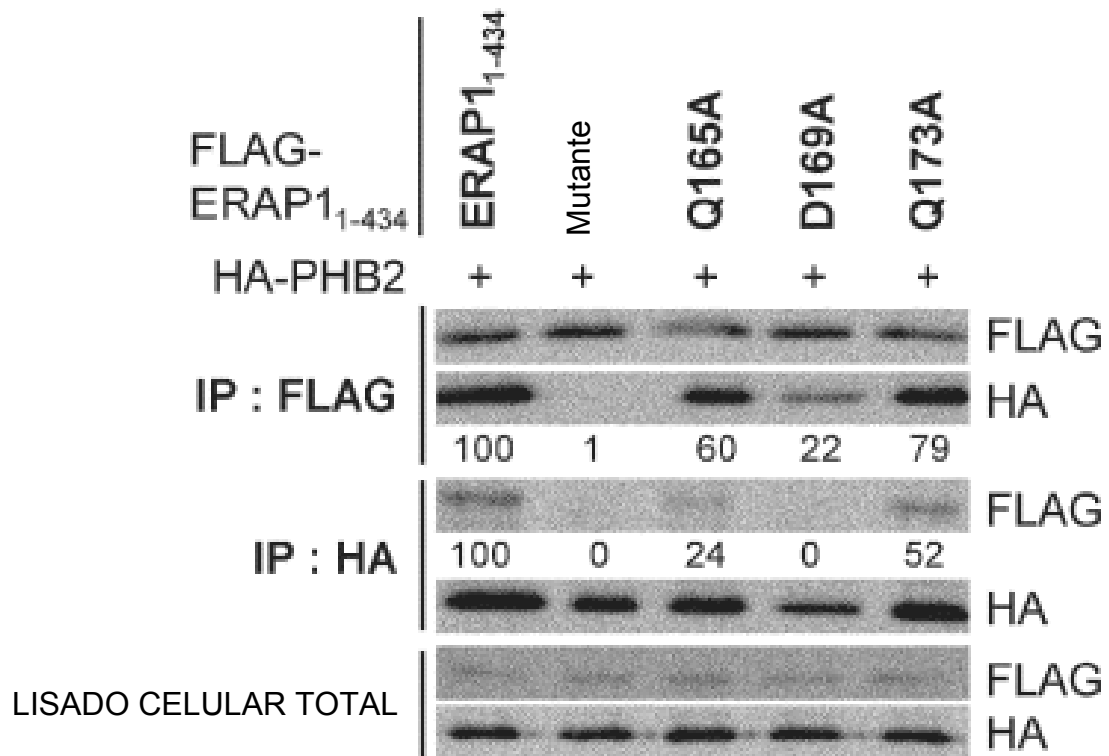


FIG. 39

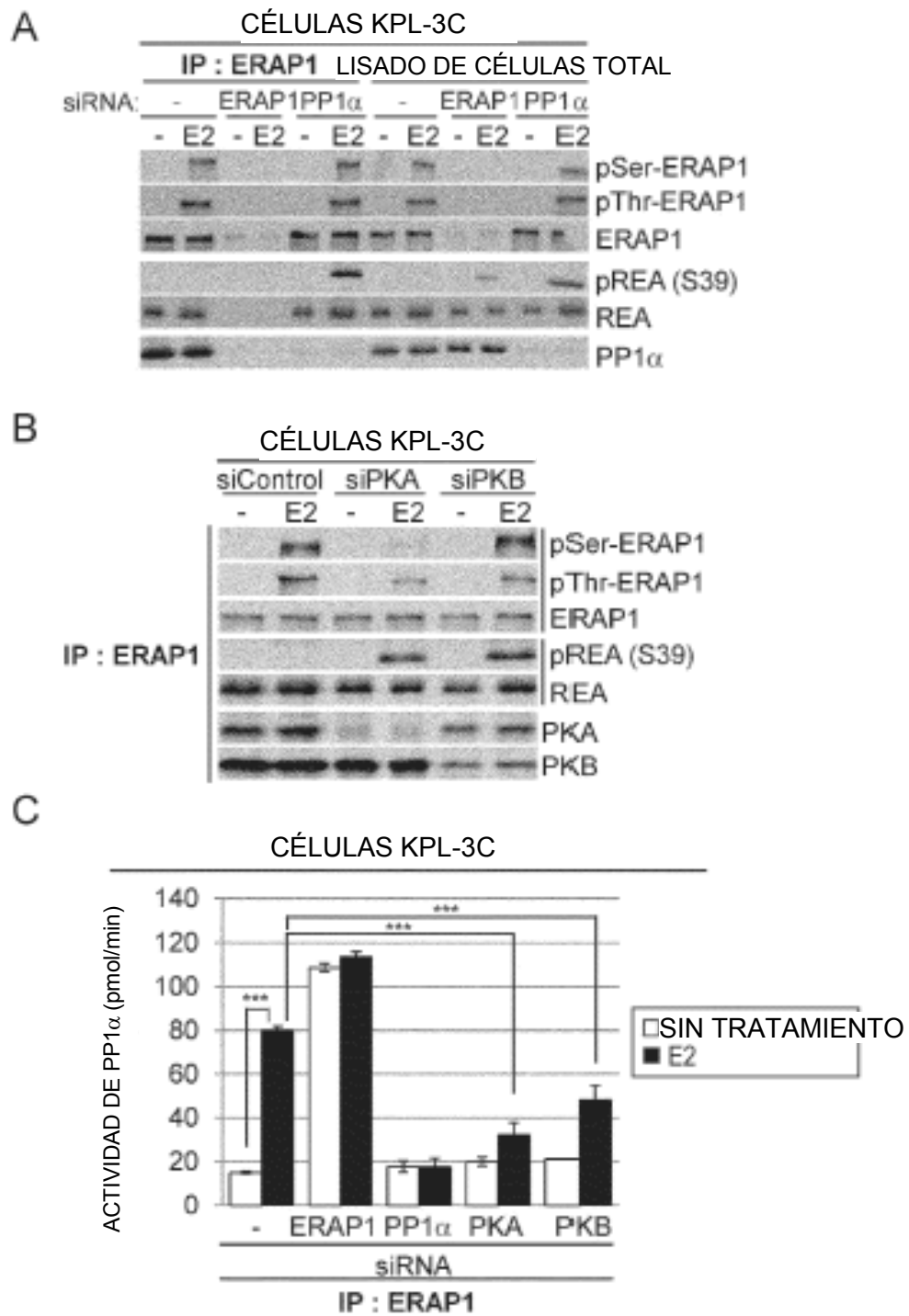


FIG. 40

CÉLULAS SK-BR-3

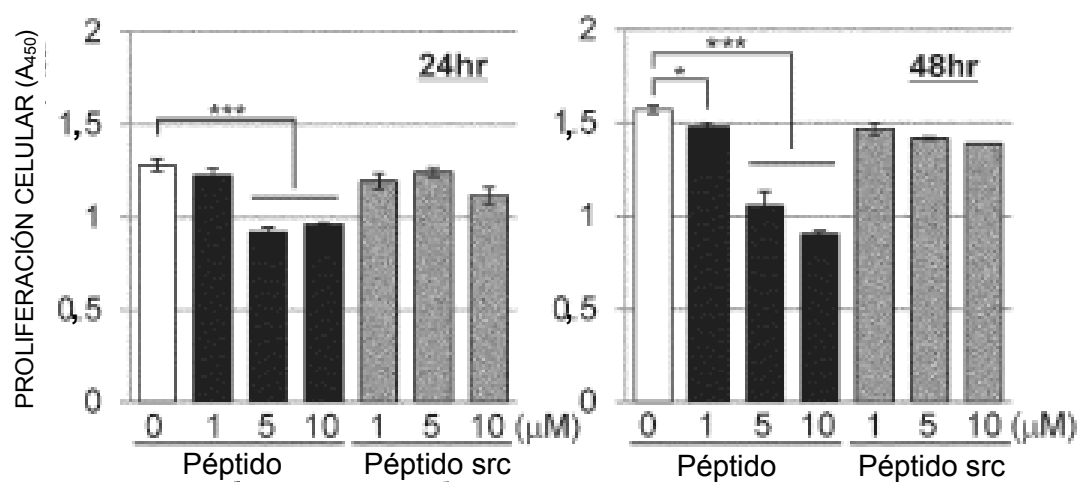
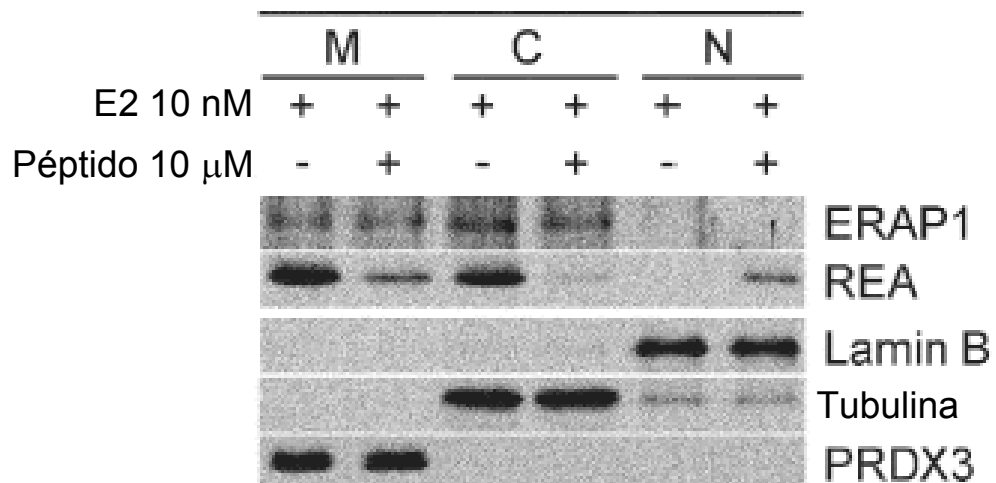


FIG. 41-1

A

CÉLULAS MCF-7



M: MITOCONDRIAS, C: CITOPLASMA, N; NÚCLEO

FIG. 41-2

B

